

Aus der
Chirurgischen Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K.-W. Jauch
und dem
Institut für chirurgische Forschung
Vorstand: Prof. U. Pohl
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Effekte des Vaskulären Immunotargeting mit anti-PECAM-1/NA/Katalase-
Konjugaten auf die Lungenfunktion nach experimenteller Transplantation von
Lungen nicht herzschlagender Spender im Großtiermodell**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Ines Victoria Huff
aus
Rosenheim/Bayern

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Florian Löhe

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bruno Reichart

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Marc Dellian

Priv. Doz. Dr. Robert Kammerer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. Gerhard Preissler

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2008

Inhalt

1.	Einleitung	6
1.1	Lungentransplantation in der Klinik	6
1.2	Mangel an Spenderorganen	7
1.3	Erweiterung des Spenderpools	9
1.4	Non Heart Beating Donors (NHBD)	10
1.5.	Bedeutung der Sauerstoffradikale bei der Entstehung des Ischämie- Reperfusionsschaden bei Non Heart Beating Donors (NHBD)	12
1.6	Reduktion der Sauerstoffradikale in der pulmonalen Endothelzelle	16
1.6.1	Ziele der antioxidativen Therapie mit Katalase	16
1.7	Das Prinzip des Vaskulären Immunotargeting	18
1.8	PECAM-1 (CD-31) als Zielantigen	19
1.8.1	Die PECAM-1 Familie	19
1.8.2	PECAM-1 Liganden	20
1.8.3	PECAM-1 Signaltransduktion	21
1.9	Eigenschaften des Anti-PECAM-1/Neutravidin/Katalase Konjugats	21
2.	Fragestellung	24
3.	Material und Methoden	25
3.1	Herstellung der anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate	25
3.1.1	Reagenzien	25
3.1.2	Herstellung und Charakterisierung der Konjugate	25
3.2	Effekte der anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf den oxidativen Stress in kultivierten Endothelzellen in vitro	27
3.2.1	Zellen und Reagenzien	27
3.2.2	Ansätze	27
3.2.3	Parameter	27
3.3	Effekte der anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf den Ischämie- Reperfusionsschaden und die Transplantatfunktion von NHBD-Spenderlungen in vivo	28
3.3.1	Tierhaltung	28
3.3.2	Operatives Vorgehen	28
3.3.2.1	Prämedikation und Narkoseführung	28
3.3.2.2	Operation der Spendertiere	29
3.3.2.3	Operation der Empfängertiere	32
3.3.2.4	Pneumonektomie	32
3.3.2.5	Transplantation	33

3.3.2.6	Schein-Operation	33
3.3.3	Parameter.....	35
3.3.3.1	Allgemeine Anmerkungen	35
3.3.3.2	Analyse des Blutbildes	35
3.3.3.3	Hämodynamische Parameter.....	35
3.3.3.4	Pulmonaler Gasaustausch	37
3.3.3.5	Dynamic Lung Compliance (C_{dyn}).....	38
3.3.3.6	Morphologische Veränderungen	39
3.3.3.7	Analyse der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF).....	40
3.3.3.8	Inflammation und oxidativer Stress	42
3.4	Experimentelle Gruppen.....	43
3.5	Statistik.....	46
4.	Ergebnisse	47
4.1	Auswirkungen der Transplantatvorbehandlung mit Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf den Organspender	47
4.1.1	Gasaustausch und Lungenfunktion.....	47
4.1.2	Hämodynamik	49
4.2	Effekte der Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf den Ischämie- Reperfusionsschaden und die Transplantatfunktion von NHBD- Spenderlungen in vivo	52
4.2.1	Makrohämodynamik und Lungenfunktion nach Transplantation.....	52
4.2.1.1	Gasaustausch	52
4.2.1.2	Pulmonale Shuntfraktion und Lungencompliance (Dynamic Lung Compliance, C_{dyn}).....	54
4.2.1.3	Hämodynamik	56
4.2.2	Morphologische Veränderungen im Transplantat	60
4.2.2.1	Myeloperoxidase Assay	60
4.2.2.2	Histologie.....	60
4.2.2.3	Analyse der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	62
4.2.3	Endothelfunktion im Transplantat.....	64
4.2.3.1	Histologie.....	64
4.2.3.2	Wet/Dry-Ratio	65
4.2.4	Freisetzung von Sauerstoffradikalen.....	66
4.2.4.1	Effekte der Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf den oxidativen Stress in kultivierten Endothelzellen.....	66
4.2.4.2	Lipidperoxidation: Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS).....	67
4.2.4.3	Oxidativer Burst der Leukozyten	68

4.3	Effekte der Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf die morphologische Veränderungen durch Konservierung der Lunge (KL)	69
4.3.1	Analyse der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	69
4.3.2	Analyse des oxidativen Stress	71
4.3.3	Myeloperoxidase-Aktivität im Gewebe der kontralateralen Spenderlunge	72
4.3.4	Histologie.....	73
4.3.5	Wet/Dry Ratio	74
4.4	Auswirkungen der Transplantatvorbehandlung auf die kontralaterale Nativlunge des Empfängers (NL)	74
4.4.1	Gasaustausch	75
4.4.2	Compliance	76
4.4.3	Analyse der bronchoalveolären Lavage	78
4.4.4	Histologie.....	79
4.4.5	Analyse des oxidativen Stress	80
5.	Diskussion	81
5.1	Non Heart Beating Donors (NHBD) zur Erweiterung des Spenderpools in der Lungentransplantation.....	81
5.2	Diskussion des Modells.....	84
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	86
5.3.1	Einfluss der Konjugatapplikation auf den Gasaustausch und die Hämodynamik des Spenders	86
5.3.1	Effekte des anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugats auf das Transplantat.....	87
5.3.3	Isolierte Effekte des anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugats auf Ischämie und Konservierung der Lunge	90
5.3.4	Auswirkungen des Ischämie-Reperfusionsschadens auf die kontralaterale Nativlunge	91
5.4	Zusammenfassung.....	93
6.	Literaturverzeichnis	96
7.	Abkürzungen	105
8.	Danksagung.....	106
9.	Lebenslauf	107

1. Einleitung

1.1 Lungentransplantation in der Klinik

Die Lungentransplantation stellt heute die Therapie der Wahl zur Behandlung terminaler Lungenerkrankungen dar und hat im Lauf der letzten Jahrzehnte einen festen Platz in der Transplantationschirurgie eingenommen.

Nach erfolgreichen experimentellen Versuchen an Hunden führte James D. Hardy 1963 in Jackson/Mississippi erstmals eine klinische Einzellungentransplantation durch. Der Empfänger verstarb allerdings 18 Tage nach Transplantation an Nierenversagen (Hardy, 1999).

Im Lauf der folgenden Jahrzehnte hat sich die Lungentransplantation kontinuierlich weiterentwickelt. Nach der ersten erfolgreichen Transplantation 1981, durchgeführt als Herz-Lungentransplantation, (Reitz et al., 1982) wurde 1983 von der Toronto Lung Transplant Group die Einzellungentransplantation etabliert und in den folgenden Jahren sowohl die Spenderauswahl, als auch die Operationstechnik weiter optimiert (Toronto lung transplant group, 1986).

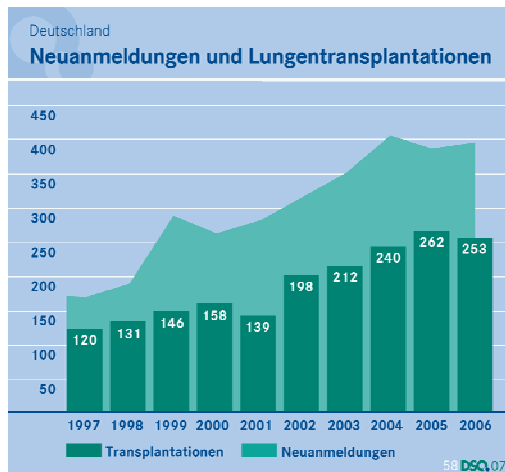
Vor allem die Einführung von Cyclosporin A als Immunsuppressivum und damit die Reduktion schwerer Komplikationen durch Organabstoßung hat wesentlich zum weiteren Erfolg der Lungentransplantation beigetragen (Haverich, 1990).

Durch die optimierte immunsuppressive Therapie konnte eine signifikant höhere Überlebensrate und verminderte chronische Abstoßung erzielt werden (Iacono et al., 2006). Neuere experimentelle Studien zeigen die Bedeutung von endotracheal appliziertem Cyclosporin A- Aerosol als zusätzliche Prävention chronischer Abstoßung.

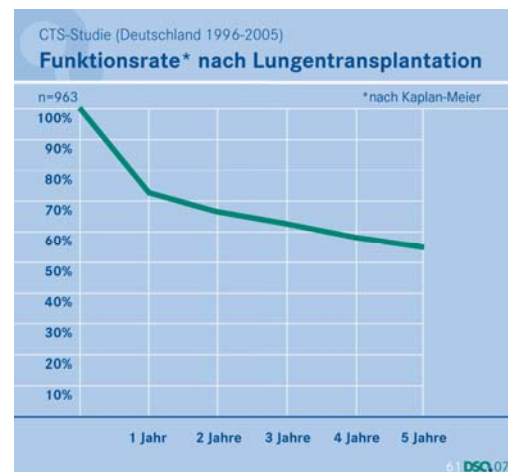
Die durchschnittliche 1-Jahres Überlebensrate nach Lungentransplantation beträgt derzeit 72 %, die 5-Jahres Überlebensrate 51% (DSO, Abb. 1.1b). Die Überlebenskurve zeigt vor allem in den ersten 3 Monaten nach Lungentransplantation einen steilen Abfall auf 80% (Hosenpud et al., 2001). Die häufigsten Ursachen hierfür sind primäres Transplantatversagen und Infektionen (Whitson et al., 2006). In der späteren Phase ist das Transplantatversagen zusätzlich durch die chronische Abstoßung mit Entstehung einer Bronchiolitis obliterans bedingt (Davis, Jr. and Pasque, 1998). Die 10-Jahres Überlebensrate nach Lungentransplantation beträgt derzeit ungefähr 20 % (Keck et al., 1999).

Als wichtigste Indikation für die Einzellungentransplantation ist die chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD) (Gunes et al., 2006) zu nennen, dagegen kommt die Doppellungentransplantation vorrangig bei der zystischen Fibrose (Mukoviszidose) zum Einsatz. Zu den häufigsten Diagnosen bei der Neuanmeldung zählen außerdem die

idiopathische pulmonale Fibrose und das Lungenemphysem (Deutsche Stiftung für Organtransplantation, DSO 2007).



1a



1b

Abb. 1.1a: Neuanmeldungen zur Lungentransplantation im Jahr 2006. Die Diskrepanz zwischen verfügbaren Spenderorganen und den Neuanmeldungen zur Lungentransplantation zeigt den deutlich bestehenden Mangel an Spenderlungen. DSO 2007

Abb. 1.1b: 5-Jahres Funktionsrate nach Transplantation bis 2005. Die 1-Jahres-Funktionsrate des Transplantats nach Lungentransplantation beträgt 72%, nach 5 Jahren noch 51%. DSO 2007

1.2 Mangel an Spenderorganen

Zur Zeit werden weltweit jährlich etwa 1000 Lungen transplantiert (Keck et al., 1999; Trulock et al., 2003). Im Jahr 2006 wurden in Deutschland 400 Patienten neu zur Transplantation angemeldet (Abb. 1.1a). Es wurden 253 Lungentransplantationen in 15 Zentren durchgeführt, davon 14 als Herz-Lungen-Transplantation.

Trotz der vielversprechenden Möglichkeiten der Lungentransplantation für Patienten mit terminalen Lungenerkrankungen fällt auf, dass die Zahl der Transplantationen nicht in einem den Neuanmeldungen entsprechendem Ausmaß zunimmt, sondern stagniert. Im Jahr 2004 standen in Deutschland 405 Neuanmeldungen 240 tatsächlich ausgeführten Transplantationen gegenüber (Abb. 1.1a, 1.1b). Tatsächlich bedeutet diese dramatische Diskrepanz, dass derzeit ca. 20% dieser lebensbedrohlich erkrankten Patienten auf der Warteliste versterben.

Der Grund für diese Tatsache ist hauptsächlich im Mangel an Spenderorganen zu suchen. Der potentielle Spender muss verschiedene Kriterien erfüllen, um für die Explantation in Frage zu kommen. Neben verschiedenen allgemeinen Voraussetzungen wie Alter des Patienten, Nikotinkonsum und ABO-Kompatibilität, ist bei der Selektion von Spenderlungen auch die Oxygenierung des Transplantats und die Dauer der mechanischen Ventilation von Bedeutung (Tab 1.1).

ABO-Kompatibilität	identisch
Alter des Organspenders	< 55 Jahre
Anamnese	kein Thoraxtrauma, minimaler Nikotinkonsum (< 20 pack years) keine Aspiration, Sepsis keine maligne Erkrankung mechanische Ventilation < 48h
PaO ₂ bei FiO ₂ 1,0 (PEEP 5 cmH ₂ O)	> 300 mmHg
Bronchoskopie	kein Hinweis auf purulentes Sekret
Thorax-Röntgenbild	kein Infiltrat

Tabelle 1.1: Kriterien zur Auswahl eines Organspenders zur Lungentransplantation

Neben dem Mangel an transplantablen Organ kommt erschwerend hinzu, dass die Lunge ein im Vergleich zu anderen Organen wie zum Beispiel der Niere bereits nach relativ kurzer Ischämiezeit Schaden nimmt. Die Ischämietoleranz bei hypothermer Konservierung beträgt bei der Lunge nur maximal 6 Stunden nach Explantation (Starnes et al., 1999), während die Niere selbst nach 24 Stunden Ischämie noch eine gute primäre Transplantatfunktion aufweist.

Im klinischen Alltag werden überdies derzeit nur Lungen zur Transplantation verwendet, die keiner relevanten sogenannten warmen Ischämie im Körper des Spenders nach Herztod und Stillstand der Blutzirkulation ausgesetzt waren. Die Folge ist, dass nur ca. 25% der Lungen von Multiorganspendern überhaupt die strengen Selektionskriterien erfüllen (Cooper and Vreim, 1999). Dies stellt neben der nach wie vor geringen Bereitschaft der Bevölkerung zur Organspende ein zusätzliches logistisches Problem der Lungentransplantation dar, denn fast immer befinden sich Spender und Empfänger in einiger räumlicher Distanz.

1.3 Erweiterung des Spenderpools

Der Mangel an Spenderorganen ist mittlerweile einer der am meisten limitierenden Faktoren in der Lungentransplantation. Folglich ist es dringend nötig, die Anzahl der zur Verfügung stehenden Spenderlunge zu erhöhen.

Neben verschiedenen Ansätzen, wie z.B. Tissue Engineering (Simpson and Bowlin, 2006) und Xenotransplantation (Groth, 2006; Cozzi et al., 2006), die sich noch in der experimentellen Phase befinden, kommt hier vor allem eine Erweiterung des Spenderpools in Frage.

Eine Möglichkeit, die Anzahl der Spenderorgane zu erhöhen ist die Lebendspende, die bei Niere und Leber bereits gute Ergebnisse zeigte und den Organmangel teilweise kompensieren konnte. Die Lebendspende eines oder mehrerer Lungenlappen zur Transplantation erfolgte erstmals 1990 und kam seitdem nur vereinzelt zur Anwendung (Mallory, Jr. and Cohen, 1997). In den meisten Fällen erhalten Kinder oder jugendliche Patienten mit schwerem respiratorischen Versagen z.B. bei cystischer Fibrose eine beidseitige Unterlappentransplantation (Mallory, Jr. and Cohen, 1997; Battafarano et al., 2000). Die Indikation zur Lebendspende ist eine akuten klinischen Verschlechterung, die eine reguläre Wartezeit auf eine Transplantat hirntoter Organspender nicht mehr erlaubt (Starnes et al., 1997; Starnes et al., 1999). Die Überlebensrate nach Lebendtransplantation beträgt zwischen 75 % und 85 % und entspricht damit dem 1-Jahres-Überleben nach Transplantation von Lungen hirntoter Organspender (Starnes et al., 1997; Starnes et al., 1999; Hosenpud et al., 2001). Allerdings beträgt die Komplikationsrate bei den Lebendspendern unabhängig von der Seite des entfernten Lungenlappens bis zu 61 %, wobei in 16 % mit schweren Komplikationen gerechnet werden muss (Battafarano et al., 2000). Damit ist die Lebendspende zur Erweiterung des Spenderpool nur bedingt geeignet und bleibt nur wenigen Patienten vorbehalten.

Die Verbesserung der Konservierungsverfahren wie z.B. die Verwendung sogenannter *low potassium dextrane* Lösungen (z.B. Perfadex®) und die Optimierung der Lagerungstemperatur der Lungentransplantate konnte zwar die Funktion der verfügbaren Organe verbessern, aber zur Lösung des Problems Organmangel nicht wesentlich beitragen (Wittwer et al., 2005).

Betrachtet man die strengen Selektionskriterien für Spenderorgane für die Lungentransplantation, liegt nahe, dass eine Modifikation dieser Kriterien zu einer größeren Anzahl verfügbarer Organe führen könnte (Tab. 1.1). Sogenannte marginale Organe erfüllen die bisher geforderten Voraussetzungen nicht oder nur teilweise. Eine Verlängerung der tolerierten hypothermen Konservierungszeit auf mehr als 6 Stunden würde beispielsweise

den Einzugsbereich eines Transplantationszentrums vergrößern und damit das Organangebot erweitern. Vor diesem Hintergrund ist die Transplantation von bisher nicht eingeschlossener Lungen herztoter Spender, sog. *Non Heart Beating Donors* (NHBD) (Egan et al., 2006; Nunez et al., 2005; Van Raemdonck et al., 2004) derzeit von großer Bedeutung.

1.4 Non Heart Beating Donors (NHBD)

Non Heart Beating Donors sind asystole Spender, bei denen ein Kreislaufstillstand eingetreten ist und keine Blutzirkulation mehr besteht. Als potentielle nicht-herzschlagende Organspender werden heute Patienten unter 70 Lebensjahren nach erfolgloser Reanimation definiert (Steen et al., 2001).

Nicht-herzschlagende Organspender können in unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden, die die ethischen und legalen Aspekte sowie das Potential für die Organtransplantation berücksichtigen (Tabelle 1.2). Voraussetzung für die Entnahme von NHBD-Organen nach Beendigung suffizienter Wiederbelebensmaßnahmen ist die bekannte Ätiologie des Herzstillstandes und das Fehlen von Kontraindikationen zur Organentnahme (Hiraga, 1992).

Kategorie	Beschreibung	Ort des Todes	Potential für die Transplantation
1	Tod bei Ankunft	Präklinisch, Notaufnahme	unbekannt
2	Erfolglose Reanimation	Notaufnahme, Intensivstation Normalstation	+ + +
3	Zu erwartender Herztod	Intensivstation	+ +
4	Herztod bei gesichertem Hirntod	Intensivstation	±

Tab. 1.2: Einteilung nicht-herzschlagende Organspender (NHBD). Non Heart Beating Donors können in unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden, die die ethischen und legalen Aspekte sowie das Potential für die Organtransplantation berücksichtigen. (Kootstra, 1997).

In der Nierentransplantation konnte gezeigt werden, dass durch die Akzeptanz von NHBD-Spenderorganen die Rate an Transplantationen mit guter anschließender Transplantatfunktion um 20 % bis 40 % gesteigert werden kann (Kootstra, 1997; Hassan et al., 1997). Dennoch ist im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedsländern von EUROTRANSPLANT die Transplantation von NHBD-Organen in Deutschland noch nicht erlaubt, aber in beginnender Diskussion.

Trotzdem führt das Sistieren der Organperfusion vor Explantation und Konservierung im Gegensatz zu hirntoten Organspendern mit erhaltener Kreislauffunktion (*Heart Beating Donor*, HBD), zu einer warmen Ischämie der NHBD-Spenderorgane, die ihrerseits zu einer relevanten Schädigung des Transplantats beitragen kann (Kootstra, 1997; Hiraga, 1992).

Im Gegensatz zu soliden Organen scheint die Lunge wegen der Möglichkeit der kontinuierlichen Beatmung und damit Oxygenierung ein ideales NHBD-Spenderorgan zu sein (Binns et al., 1996). Durch die Explantation der Lunge in Inspirationsstellung (Abb. 1.2) kann ein hoher alveolärer Sauerstoffpartialdruck erzielt werden. Durch diese sogenannte *oxygenierte Ischämie* (Weder et al., 1995), d.h. der Versorgung des Lungenparenchyms mit Sauerstoff auch nach Beendigung der pulmonalen Perfusion kann der Stoffwechsel in der Lunge über eine längere Zeit erhalten werden und die Schädigung des Organs durch Hypoxie bleibt gering (Fischer et al., 2001).

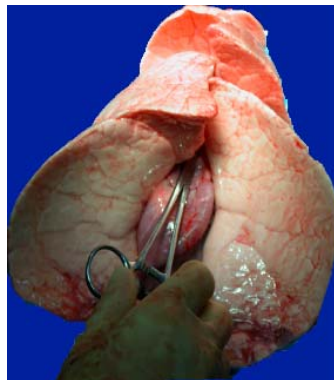


Abb. 1.2 : Explantierte Lungen in Inspiration. Durch die Explantation in Inspiration (*oxygenierte Ischämie*) ist eine Versorgung des Lungenparenchyms mit Sauerstoff auch während der Konservierung gewährleistet.

1.5. Bedeutung der Sauerstoffradikale bei der Entstehung des Ischämie-Reperfusionsschaden bei Non Heart Beating Donors (NHBD)

Der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) ist ein bekanntes und unvermeidbares Phänomen bei Transplantationen. In den meisten Fällen ist er die Ursache für eine primäre Organdysfunktion (Cryer, 1977; Post and Messmer, 1997). Während Transplantate hirntoter Spender insbesondere durch die kalte Ischämie (Konservierung) geschädigt werden, kommt es nach Transplantation von Organen von Non Heart Beating Donors zu einer erheblichen Schädigung durch die warme Ischämie nach Sistieren der Organperfusion.

Von Löhe et al. wurde in tierexperimentellen Untersuchungen die Lungenfunktion von NHBD-Spenderlungen nach Transplantation mit der Funktion von Organen herzschlagender Spender (HBD) verglichen. Nach einer nur 90-minütigen warmen Ischämie zeigen die Lungen der NHBD nach Transplantation einen signifikant niedrigeren PaO_2 und eine wesentlich höhere CO_2 -Retention als die Organe der HBD, die ohne Ischämie 18 Stunden gelagert wurden. Trotzdem zeigten die NHBD Lungen unter Beatmung mit 100% Sauerstoff PaO_2 -Werte von ca. 300 mmHg (Loehe et al., 2002). Damit liegen die Resultate der NHBD durchaus noch in einem Bereich, der diese Lungen trotz verschlechterter Funktion als noch für die Transplantation geeignet erscheinen lässt.

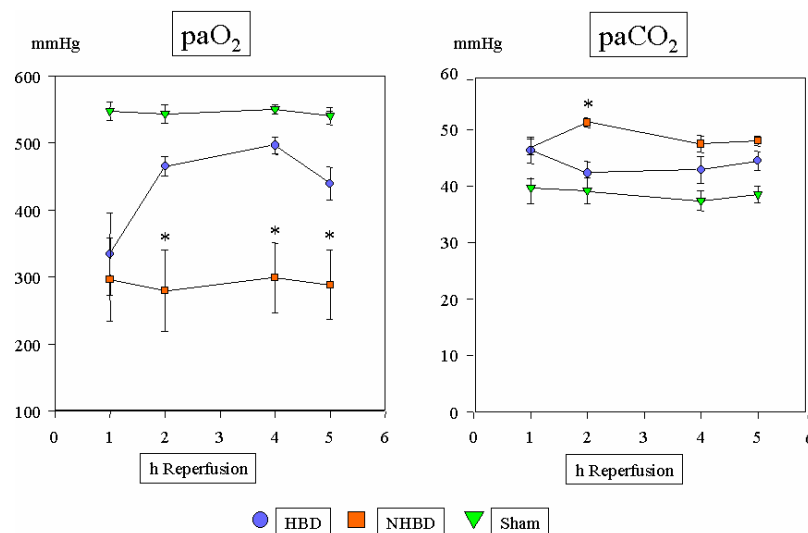


Abb. 1.3: Gasaustausch NHBD-Lungen. NHBD = Non Heart Beating Donor, HBD = Heart Beating Donor, Sham = scheinoperierte Tiere; $P < 0,05$ vs. Sham, FiO_2 100%. Nach warmer Ischämie zeigen die Lungen der NHBD nach Transplantation einen signifikant niedrigeren PaO_2 und eine höhere CO_2 -Retention als die Organe der HBD und scheinoperierter Tiere (Sham). (Loehe et al., 2002)

Die Lungen der NHBD weisen durch eine deutliche Verstärkung des bekannten Ischämie-Reperfusionsschadens eine ARDS-artige Schädigung auf (Loehe et al., 2002). Der Grund für die verstärkte Schädigung der Lungen infolge der warmen Ischämie sind erhebliche Veränderungen in der pulmonalen Mikrozirkulation (Abb. 1.4a, 1.4.b). Bereits während Ischämie und Konservierung kommt es zu Veränderungen am Transplantat, dabei steht die pulmonale Endothelzelle im Mittelpunkt.

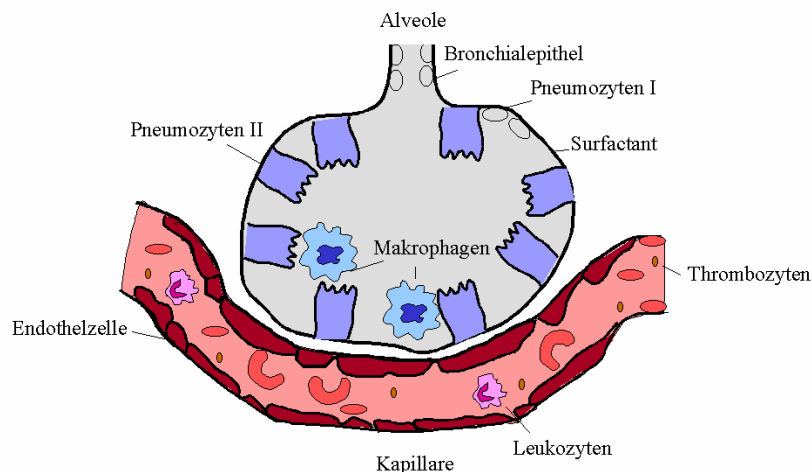


Abb. 1.4a: gesunde Alveole. Schematische Darstellung einer gesunden Alveole ohne IRS-typische Schädigung. Einzelheiten siehe Text.

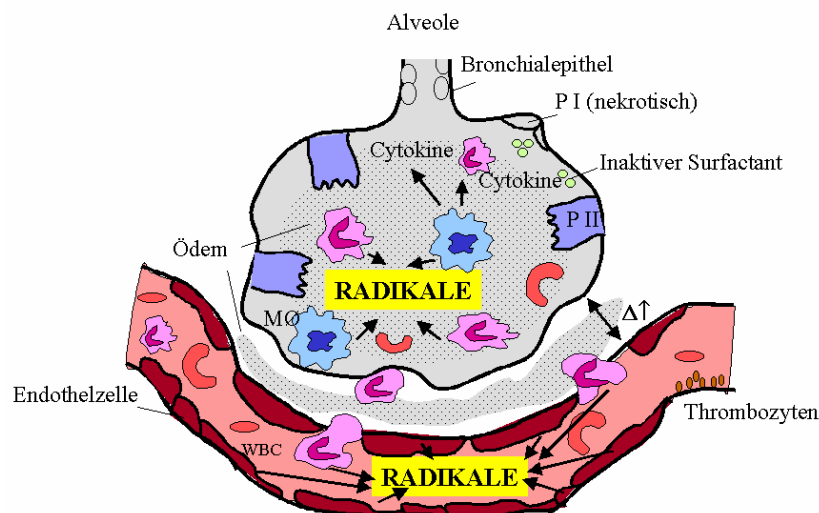


Abb. 1.4b: Alveole mit Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS). Im Rahmen des IRS entstehen Sauerstoffradikale. Dadurch kommt es primär zur Schädigung des Endothels und damit zur Ödembildung. Die zusätzliche Aktivierung von Leukozyten trägt letztendlich zu einer inflammatorischen Reaktion in der pulmonalen Mikrozirkulation bei.

Neben der Verminderung der ATP-Synthese in der ischämischen Phase, die zu einer Depletion von ATP und damit zum Funktionsverlust der ATP-abhängigen Ionenpumpen mit konsekutiver Elektrolytverschiebung führt, spielt vor allem die Entstehung reaktiver Sauerstoffmetaboliten in Leukozyten und Endothelzellen eine große Rolle (Post and Messmer, 1997).

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gehören freie Radikale (Superoxidanion O_2^- , Hydroxyanion OH^- , Peroxyradikal aus Lipiden LOO- und Alkoxyradikal LO-), stabile molekulare Oxidantien (Wasserstoffperoxid H_2O_2 , Lipidhydroperoxid LOOH) und angeregte Sauerstoffmoleküle (Singulet-Sauerstoff 1O_2). Durch die Reaktion des Superoxidanions mit Stickstoffmonoxid (NO) entsteht zudem Peroxynitrit ($ONOO^-$), das ebenfalls eine hochreaktive Verbindung darstellt. Sauerstoffradikale induzieren oxidativen Stress und spielen eine bedeutende Rolle in der Entstehung verschiedener Pathomechanismen, wie z. B. bei Inflammation, rheumatoider Arthritis, Asthma, Psoriasis und Kontaktdermatitis. Oxidativer Stress kann als Ungleichgewicht zwischen zellulärer Produktion von Sauerstoffradikalen und körpereigenen antioxidativen Abwehrmechanismen definiert werden (Geronikaki and Gavalas, 2006). Im Organismus entstehen ständig reaktive Sauerstoffspezies als Nebenprodukt von Stoffwechselreaktionen und der Zellatmung (Fisher et al., 1999). Durch die Sauerstoffradikale kommt es zu einer direkten Schädigung des Endothels, die endotheliale Barriere ist nicht mehr intakt und die Gefäßpermeabilität wird erhöht. Die akute Phase des Ischämie-Reperfusionsschadens mit einer Steigerung der alveolo-kapillären Permeabilität konnte experimentell bereits 30 Minuten nach Reperfusion nachgewiesen werden (Eppinger et al., 1991). Durch intraalveoläres und interstitielles Ödem sinkt die Dehnbarkeit (Compliance) der Lunge und führt zu einem Funktionsverlust. Weiter entsteht aus der daraus resultierenden Hämokonzentration eine Erhöhung der Blutviskosität und damit eine kapilläre Minderperfusion in der Lungenstrombahn (Land W, 1996).

Zusätzlich spielen indirekte Mechanismen bei der Schädigung des Gewebes eine Rolle. Es kommt zur Hochregulation verschiedener Adhäsionsmoleküle (z.B. P-, E-Selektin) und dadurch zur Rekrutierung von Leukozyten. Potente Mediatoren wie Thromboxan A_2 (TXA_2) und Leukotrien B_4 (LTB_4) werden als Folge der stattfindenden Lipidperoxidation freigesetzt (Sakamaki et al., 1996; Eppihimer and Granger, 1997) (Abb. 1.5).

Durch den Verlust der cGMP-vermittelten Gefäßrelaxation kommt es zum Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstands und darüber hinaus zur Leukozyten- sowie Thrombozytenadhäsion am vorgeschädigten pulmonalen Endothel (Shiraishi et al., 2001). Nach Reperfusion kommt es zur Depletion von Stickstoffmonoxid (NO), da Sauerstoffradikale mit NO reagieren und Nitritverbindungen bilden. Zusammen mit der Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich und des Einflusses der hypothermen Lagerung kann es zum primären Transplantatversagen unmittelbar nach Reperfusion (Post

and Messmer, 1997) kommen (*no-reflow- Phänomen*) (Post and Messmer, 1997). Entsprechend konnte durch die Gabe von Nitroglycerin als NO-Donator eine verbesserte Lungenfunktion bei NHBD-Transplantaten erreicht werden (Loehe et al., 2004).

Im Rahmen des Ischämie Reperfusionsschadens werden Leukozyten aktiviert, es kommt zur Leukozyten Extravasation und Migration in das Interstitium und weiter bis in die Alveolen. Dadurch kommt es zu einer zusätzlichen Produktion von Sauerstoffradikalen durch Leukozyten. Die Akkumulation und Adhärenz von Leukozyten am Endothel kann ihrerseits Mikrozirkulationsstörungen verursachen, d.h. Kapillaren werden nach initial erfolgreicher Reperfusion sekundär nicht mehr perfundiert werden (*reflow-paradox-Phänomenon*) (Post and Messmer, 1997).

Insgesamt weisen die Organe der asystolen Spender (NHBD) durch den verstärkten Ischämie-Reperfusionsschaden nach warmer Ischämie eine im Vergleich zu Organen hirntoter Spender deutlich reduzierte Lungenfunktion auf.

Somit stellt gerade die Transplantation von NHBD-Organen ein interessantes Modell zur Untersuchung und Beurteilung des Ischämie-Reperfusionsschadens dar.

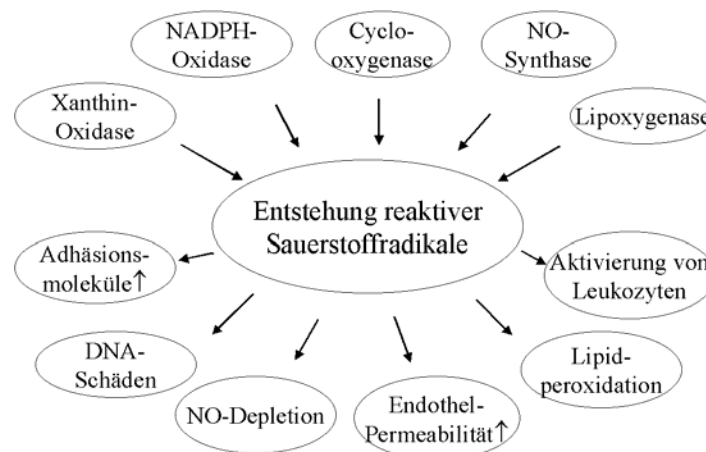


Abb. 1.5: Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale und deren Auswirkung. Im Organismus entstehen durch verschiedene zelleigene Enzyme reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung. Zusätzlich werden ROS als Reaktion auf eine Inflammation freigesetzt.

1.6 Reduktion der Sauerstoffradikale in der pulmonalen Endothelzelle

Wie bereits dargestellt, stellt bei der Lungentransplantation das pulmonalvaskuläre Endothel primären Angriffspunkt der reaktiven Sauerstoffmetaboliten dar. Deshalb ist ein Therapieansatz zur Verbesserung der Lungenfunktion vorgeschädigter Transplantate aus asystolen Spendern der Schutz der Endothelzelle vor Sauerstoffradikalen.

In der Vergangenheit wurden bereits mehrere Strategien zum Schutz vor Schädigung durch Sauerstoffradikale untersucht. Dazu eignen sich neben Substanzen wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid (NO), Vitamin E, Allopurinol und Diphenyliodonium (DPI) besonders Enzyme mit radikalreduzierender Wirkung (Geronikaki and Gavalas, 2006). Auf die antioxidative Wirkung bestimmter Enzymen, insbesondere von Katalase, soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.6.1 Ziele der antioxidativen Therapie mit Katalase

Während des Ischämie-Reperfusionsschadens in der Endothelzelle anfallendes H_2O_2 reagiert in Anwesenheit von Kupfer und Eisen zu Hydroxylanionen, die oxidativen Stress und damit Endothelzellschädigung verursachen. Katalase ist in der Lage, diese Reaktion zu verhindern indem sie H_2O_2 in der Endothelzelle zu Wasser und Sauerstoff reduziert (Abb. 1.6).

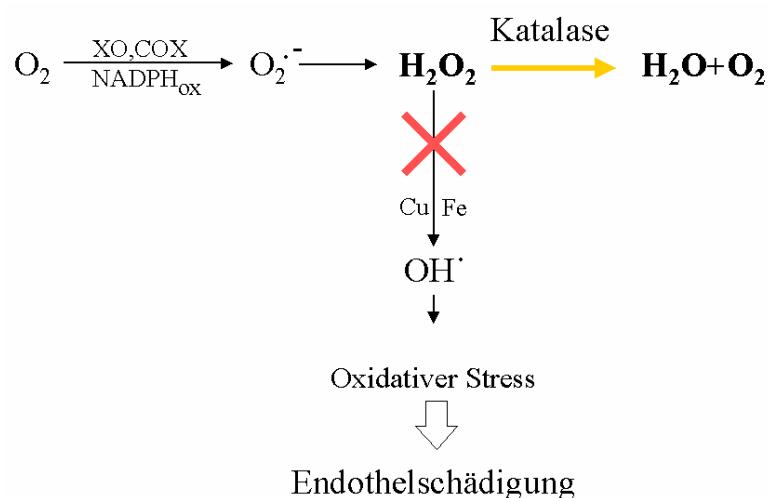


Abb. 1.6: Metabolismus des Enzyms Katalase. XO = Xanthinoxidase, COX = Cyclooxygenase, NADPHox = NADPH-Oxidase. H_2O_2 reagiert in Anwesenheit von Eisen und Kupfer zu OH^{\cdot} . Katalase ist in der Lage, diese Reaktion zu blockieren und reduziert H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff.

Katalase wird physiologischer Weise in Endothelzellen und anderen Zellen exprimiert. Die additive Gabe exogener Katalase wurde bereits vielfach in der Transplantationsforschung eingesetzt (Muzykantov, 2001b).

Um mit Katalase einen wirksamen antioxidativen Schutz des pulmonalen Endothels im Rahmen des verstärkten Ischämie-Reperfusionsschadens vorgeschädigter Spenderorgane zu erzielen, sind jedoch einige Voraussetzungen erforderlich. Katalase soll sich möglichst stark am Wirkort, d.h. organspezifisch in der Lunge, und weniger in anderen Organen ansammeln, da sonst sehr große Mengen an Enzym nötig wären, um eine ausreichende lokale Konzentration in der pulmonalen Mikrozirkulation zu gewährleisten.

Außerdem soll Katalase endothelspezifisch wirken, da wie oben dargestellt (siehe auch S. 12) das Endothel den primären Angriffspunkt der Schädigung durch reaktive Sauerstoffmetaboliten darstellt.

Letztlich ist auch eine Internalisierung der Katalase in die Endothelzelle erforderlich, da sich die Radikale nicht nur an der Zelloberfläche, sondern vor allem im Zytosol der Endothelzellen befinden und eine intrazelluläre Reduktion des Oxidativen Stresses in der Endothelzelle gewährleistet werden soll.

Bisher war die Therapie des antioxidativen Stress nach Ischämie-Reperfusionsschaden der Lunge mit Katalase problematisch. Das Enzym zeigte weder Organ- noch Endothelselektivität und hatte eine überwiegend extrazelluläre Wirkung. Ein zusätzliches Problem war die kurze Halbwertszeit der Katalase (Muzykantov, 2001b).

Um diese Probleme zu lösen wurden in den letzten Jahren einige Modifikationen des Enzyms Katalase entwickelt. Aber auch die Enkapsulierung (Yusa et al., 1984) und die Pegylierung (Walther et al., 1990) von Katalase führten zwar zur Internalisierung in die Endothelzelle und verlängerten die Zirkulationszeit, es zeigte sich aber mit beiden Modifikationen keinerlei Endothel- und Organspezifität für die Lunge. Insgesamt sind diese Ansätze damit nicht ideal, um den intrazellulären oxidativen Stress in der pulmonalen Endothelzelle zu reduzieren.

1.7 Das Prinzip des Vaskulären Immunotargeting

Um das antioxidative Potential der Katalase nützen zu können, ist also eine andere Strategie nötig, die das Enzym in ausreichendem Maß an die Endothelzellen der Lunge transportiert und eine anschließende intrazelluläre Reduktion der Sauerstoffradikale gewährleistet. Dafür bietet sich als neuartige Strategie das sogenannte *Vaskuläre Immunotargeting* an (Muzykantov, 2001a; Muzykantov et al., 1996).

Dabei wird der Wirkstoff und Antikörper über einen Crosslinker (z.B. Neutravidin) zu einem Konjugat verbunden (Muzykantov et al., 1999). Aus mehreren Konjugaten entsteht ein Nanopartikel. Die Nanopartikel können mit ihrer Antikörper-Komponente multimere Bindungen mit spezifischen Antigenen auf der Endothelzelloberfläche eingehen. Wählt man ein geeignetes Zielantigen aus, kann der Nanopartikel mit dem Wirkstoff anschließend auch in das Zytosol internalisiert werden. Je nach Auswahl des Wirkstoffs kann dieser verschiedene Funktionen in der Endothelzelle erfüllen, die therapeutisch genutzt werden können (Atochina et al., 1998; Christofidou-Solomidou et al., ; Christofidou-Solomidou et al., 2003; Danilov et al., 2001), (Abb.1.7).

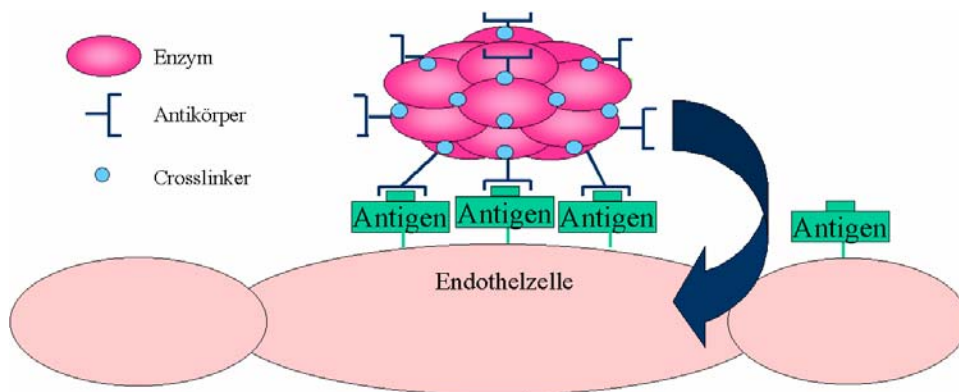


Abb. 1.7: Prinzip des Vaskulären Immunotargeting. Ein Enzym als Wirkstoff wird über einen Crosslinker mit einem Antikörper verbunden. Aus mehreren derartigen Konjugaten entsteht ein Nanopartikel mit spezifischen Eigenschaften bezüglich Adhäsion und Funktion.

1.8 PECAM-1 (CD-31) als Zielantigen

Nicht alle Oberflächenantigene sind für den Transport von Katalase an das pulmonale Endothel geeignet. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Selektine wie zum Beispiel P- und E- Selektin eine im Vergleich zu anderen Antigenen zu geringe Oberflächenexpression auf der Endothelzelle aufweisen. Obwohl Selektine auf pathologisch verändertem Endothel verstärkt exprimiert werden, ist die Bindungskapazität des Konjugats auf der Oberfläche gering und es kommt zu keiner ausreichenden Akkumulation des Konjugats in der Lunge. Eine therapeutische Wirkung der antioxidativen Substanz in Kombination mit Selektinen ist daher nicht zu erwarten (Scherpereel et al., 2002).

Im Vergleich dazu scheint das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) ein besseres Zielantigen zu sein. Konjugate, die monoklonale anti- ACE Antikörper enthalten, sind zum einen endothelspezifisch, zusätzlich konnte eine Akkumulation in der Lunge und Internalisierung in die Endothelzelle nachgewiesen werden (Muzykantov et al., 1996; Atochina et al., 1998). Allerdings wird die Expression von ACE auf der Endothelzelloberfläche durch Inflammation und Freisetzung von Sauerstoffradikalen supprimiert. Damit ist auch eine Konjugation von Katalase mit ACE in unserem Modell nicht sinnvoll.

Auch ICAM-1 wurde bereits als Zielantigen für den antikörpervermittelten Transport verwendet. ICAM ist prinzipiell ein gut geeignet, weil es konstitutiv exprimiert wird und im Rahmen einer Inflammation hochreguliert wird. Anti-ICAM-1 Konjugate sind allerdings nicht wie in diesem Versuch notwendig zur Reduktion der intrazellulären Radikale geeignet, da sie kaum internalisiert werden (Atochina et al., 1998).

1.8.1 Die PECAM-1 Familie

Die Suche nach einem geeigneten Zielantigen für den Transport von Katalase an die Endothelzelle und anschließender Internalisierung des Enzyms führte schließlich zum Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1).

PECAM-1 (CD-31) ist ein transmembranes Glykoprotein der Immunglobulin Superfamilie mit einem Molekulargewicht von 130 kD. PECAM-1 besitzt sogenannte *intracytoplasmatic immunoreceptor tyrosine inhibitory motifs* (ITIMs), die über Phosphorylierung inhibitorisch auf die Aktivierung und Rekrutierung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) wirken. Daher wird PECAM-1 in neueren Klassifikationen zusätzlich der Ig-ITIM Subklasse von Adhäsionsrezeptoren zugeordnet (Newman, 2003; Newman et

al., 1990). PECAM-1 hat einen extrazellulären Teil mit 6 Domänen aus 574 Aminosäuren, eine transmembrane Domäne und einen intrazellulären Anteil bestehend aus 118 Aminosäuren (Abb. 1.8)

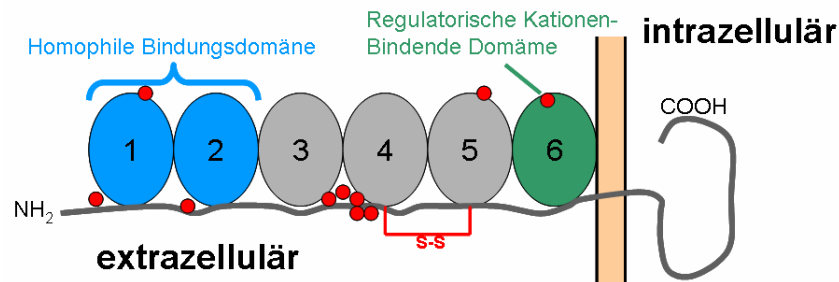


Abb. 1.8: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1). (Modifiziert nach Newman et.al. 1994)

PECAM-1 wird auf Endothelzellen konstitutiv exprimiert. Neben Endothelzellen ist PECAM-1 auch auf neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten, Makrophagen, NK-Zellen, naiven T- und B-Zellen und Mastzellen vorhanden. Auf Fibroblasten, Epithelzellen und Erythrozyten wird es dagegen nicht exprimiert.

1.8.2 PECAM-1 Liganden

PECAM-1 ist in der Lage, über das N-terminale Ende der distalen Domäne homophile Bindung und Interaktionen mit PECAM-1 benachbarter Zellen (z.B. Endothelzellen, Leukozyten, Thrombozyten) zu vermitteln. Daher spielt PECAM-1 eine bedeutende Rolle für die Aufrechterhaltung der vaskulären Barriere, Adhäsion und transendothelialen Migration von Leukozyten und der Formation neuer Blutgefäße im Rahmen der Angiogenese (Newman and Newman, 2002; Jackson, 2003; Newman and Newman, 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass monoklonale anti-PECAM-1 Antikörper antiinflammatorisch wirken können, indem sie die Transmigration von Leukozyten durch das Endothel in vitro, sowie eine verminderte Rekrutierung von Neutrophilen in vivo bewirken (Liao et al., 1996; Vaporciyan et al., 2001).

PECAM-1 hat auch Einfluss auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen. Die Expression von PECAM-1 auf gesunden Zellen verhindert die Interaktion dieser Zelle

mit Makrophagen. Im Gegensatz dazu wird PECAM-1 in apoptotischen Zellen aus noch nicht bekannten Gründen weniger exprimiert, was letztlich zur Phagozytose der abgestorbenen Zellen durch Makrophagen führt (Brown et al., 2002).

Neben homophilen Bindungen kann PECAM-1 zusätzlich heterophil mit Liganden wie zum Beispiel CD38, dem 120-kD-Ligand auf T-Zellen und Integrin $\alpha v \beta 3$ interagieren.

1.8.3 PECAM-1 Signaltransduktion

Nach Bindung von Liganden an PECAM-1 kommt es zur Zellaktivierung. Hierbei werden die Tyrosin- und Serinreste des zytoplasmatischen Anteils von PECAM-1 phosphoryliert. Dies geschieht in Endothelzellen durch mechanische Kraft, die direkt auf PECAM-1 einwirkt (Osawa et al., 2002), durch Adhäsion, Scherkräfte, osmotischen Schock, sowie Kontakt mit Fibronektin und Kollagen. (Newman and Newman, 2003). Schließlich führt dies zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden und zu Interaktionen verschiedener cytoplasmatischer Proteine, z.B. *Src homology 2 (SH2)* mit Teilen des Zytoskeletts (Newman and Newman, 2003).

Auf jeder Endothelzelle existiert ca. 1 Million Kopien von PECAM-1, dabei ist die Dichte im interzellulären Bereich des Endothels besonders hoch. (Newman, 1994). Da die Lunge im Vergleich zu anderen Organen mit ca. 30% der Gesamtendothelfläche des Körpers eine außerordentlich hohe Anzahl von PECAM-1 aufweist, ist PECAM-1 als Zielantigen für den Transport von Katalase an die pulmonale Endothelzelloberfläche und einer therapeutisch wirksamen Akkumulation besonders in der Lunge sehr gut geeignet (Weder et al., 1995).

1.9 Eigenschaften des Anti-PECAM-1/Neutravidin/Katalase Konjugats

Die Kopplung von Katalase an den anti-PECAM-1-Antikörper erfolgt durch Biotinylierung von Katalase und Antikörper. Neutravidin (NA) als Crosslinker ermöglicht die Internalisierung des so entstandenen Konjugats (Wiewrodt et al., 2002). (ausführliche Beschreibung: siehe Kapitel Material und Methoden).

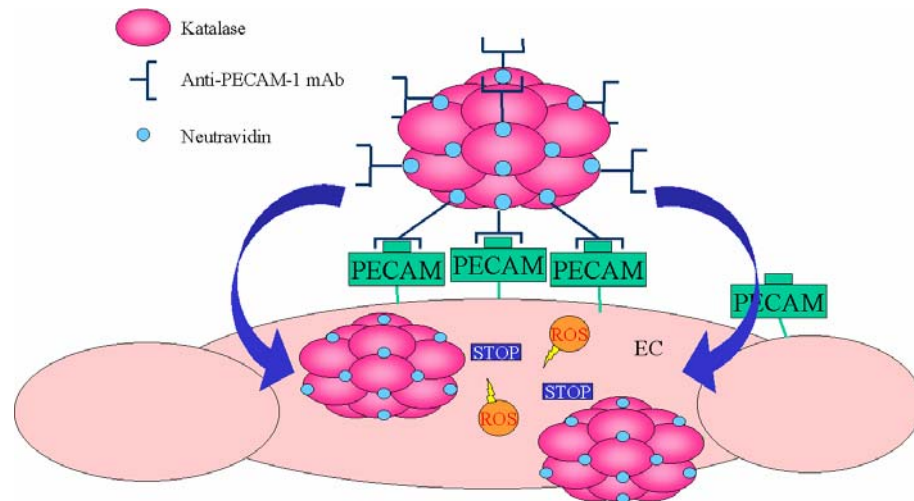


Abb. 1.9: Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat. Katalase wird über Neutravidin als Crosslinker mit einem monoklonalen anti-PECAM-1-Antikörper verbunden. Aus mehreren derartigen Konjugaten entsteht ein Nanopartikel mit spezifischen Bindungseigenschaften auf der Endothelzelle. Durch die Internalisierung des Nanopartikels ist die intrazelluläre antioxidative Wirkung gewährleistet.

Entscheidend für die Funktion des entstandenen Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugats, also Bindung an das Zielantigen und Internalisierung, ist das molare Verhältnis der einzelnen Komponenten. Dieses spezifische Verhältnis bedingt die Größe der Konjugate. Die Partikelgröße ist entscheidend für dessen intrazelluläre Aufnahme. Die optimale Partikelgröße ist je nach der Zellart, in die ein Konjugat internalisiert werden soll, unterschiedlich. Während Makrophagen Partikel von bis zu 1µm internalisieren können, zeigen Endothelzellen bei 80-350nm intrazelluläre Akkumulation (Li et al., 1999; Wiewrodt et al., 2002).

Bei der Konjugation von anti-PECAM-1, Neutravidin und Katalase entstehen die größten Partikel bei einem molaren Verhältnis von 2:1 Antikörper/Katalase zu Neutravidin. Diese werden nicht internalisiert. Nur Konjugate mit einer Größe zwischen 200 u. 300 nm werden, nachdem sie eine multivalente Bindung mit PECAM-1 auf der Endothelzelloberfläche eingegangen sind, in ausreichender Menge in die Endothelzelle aufgenommen. Größere oder kleinere Nanopartikel bleiben an der Endothelzelloberfläche oder werden nur unzureichend internalisiert (Wiewrodt et al., 2002).

Wie Versuche verschiedener Arbeitsgruppen zeigen, erfüllt das Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat alle Kriterien für eine suffiziente antioxidative Therapie der Endothelzellen mit Katalase (Christofidou-Solomidou and Muzykantov, 2006; Ding et al., 2005; Muzykantov, 2005).

Der hohe Anteil der Lunge am Gesamtendothel und damit die hohe Dichte von PECAM-1 führt zu einer relativen Organselektivität des Konjugats. Dies belegt eine Untersuchung von Scherpereel et al (Scherpereel et al., 2002). Seine Gruppe untersuchte im Großtiermodell verschiedene Organe eine Stunde nach systemischer Injektion eines monoklonalen anti-PECAM-1-Antikörpers gegenüber IgG als Kontrollantikörper. Anti-PECAM-1, nicht aber IgG reichert sich aufgrund der großen Endothelfläche vor allem in der Lunge, wesentlich weniger jedoch in anderen Organen wie z.B. in Leber und Milz an.

Das Konjugat wird in vitro in humane Umbilikalvenenendothelzellen (HUVECs) internalisiert (Kozower et al., 2003). Es werden nur multimere, nicht aber monomere Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate in die Endothelzellen aufgenommen. Dieser makropinozytose-artige Vorgang ist noch nicht vollständig verstanden. Er ist unabhängig von Clathrinen und Caveolin und wird durch Signalwege reguliert, die interessanterweise in ähnlicher Weise auch bei der Adhäsion von Leukozyten am Endothel eine Rolle spielen (z.B. Src-Kinase, Rho-Kinase), (Muro et al., 2003b; Muro et al., 2004).

Ebenfalls in vitro konnte gezeigt werden, dass Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate in der Lage sind, HUVECs vor dem schädlichen Einfluss der Sauerstoffradikale zu schützen (Sweitzer et al., 2003).

Als Marker für die Zellschädigung diente hier die Freisetzung von Chrom⁵¹ nach Zugabe von 5mM H₂O₂, die durch die Addition von Anti-PECAM-1/Katalase Konjugaten signifikant verringert werden konnte. Durch anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate konnte zusätzlich eine Reduktion der H₂O₂ Konzentration in vitro erreicht werden.

Die Konjugation von Katalase mit dem anti-PECAM-1 Antikörper führt außerdem dazu, dass die Einzelkomponenten des Konjugats vor Proteolyse geschützt werden und damit längere Zirkulationszeiten der Wirkstoffe erreicht werden können (Dziubla et al., 2005).

Der positive Einfluss der antioxidativen Therapie mit Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugaten in vitro konnte auch in vivo auf die Lungenfunktion belegt werden. Im Rattenversuch wurden Lungen unmittelbar nach der Explantation in das Empfängertier implantiert, das Versuchsprotokoll beinhaltet keine prolongierte Ischämiezeit des Organs durch Konservierung. Die mit dem Konjugat behandelten Transplantate zeigten 4h nach Reperfusion signifikant bessere Sauerstoffpartialdrücke im Vergleich zu Organen, die nur mit NaCl behandelt wurden (Kozower et al., 2003).

2. Fragestellung

Insgesamt zeigen die eingangs dargestellten Voruntersuchungen, dass anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate in vitro spezifisch an Endothelzellen binden und die durch reaktive Sauerstoffspezies induzierte endotheliale Dysfunktion verhindern können. Auch in vivo reduzierte der Einsatz des anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugats die Effekte von oxidativem Stress auf die endotheliale Gefäßoberfläche. Entsprechend zeigten Kozower et al. im Lungentransplantationsmodell (Heart Beating Donors) der Ratte (Kozower et al., 2003) eine deutliche Verbesserung der Lungenfunktion nach Vorbehandlung der Transplantate mit dem anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat. Offen bleibt jedoch, ob die vielversprechenden Ergebnisse des Rattenmodells auch im Großtiermodell bestätigt werden können. Insbesondere bleibt zu klären, inwieweit ähnliche Effekte auch auf die Transplantatfunktion vorgeschädigter Spenderlungen von NHBD erzielt werden können. In Voruntersuchungen anderer Arbeitsgruppen (s. S. 23) wurde ein für die Klinik nicht repräsentativer Ansatz ohne Lagerung des Organs vor Implantation und damit mit einer damit minimalen Ischämiezeit der Lungen gewählt. Daher ist zur weiteren Untersuchung der Effekte des Konjugats auf die Lungenfunktion, insbesondere im Hinblick auf die Erweiterung des Spenderpools um die NHBD-Lungen ein kliniknahes Transplantations-Setting zu bevorzugen.

In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung des anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugats im Großtiermodell unter Verwendung von durch warme Ischämie vorgeschädigten NHBD-Spenderlungen analysiert werden.

Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche morphologischen Veränderungen bewirkt die Vorbehandlung der NHBD-Lungen mit Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugaten nach warmer Ischämie und zusätzlicher hypothermer Langzeitkonservierung ?
2. Welche Auswirkungen hat die antioxidative Spendervorbehandlung auf Morphologie und Funktion der transplantierten Lunge?
3. Welche Effekte auf morphologische und funktionelle Veränderungen können an der kontralateralen Nativlunge des Organempfängers beobachtet werden (*distant organ injury*)?

3. Material und Methoden

3.1 Herstellung der anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate

3.1.1 Reagenzien

Für die Versuche der hier vorliegenden Arbeit wurden folgende Antikörper verwendet: monoklonaler Maus anti-Schwein-PECAM-1 Antikörper (Klon mAb 62), kreuzreagierend mit humanem PECAM-1 (zur Verfügung gestellt von R. Wiewrodt, Mainz). Alle anderen Reagenzien stammen, wenn nicht anders beschrieben, von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland).

3.1.2 Herstellung und Charakterisierung der Konjugate

Die Einzelkomponenten des Konjugats wurden im Rahmen einer Kooperation von V. Muzykantov, Institute for Environmental Medicine and Department of Pharmacology, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA zur Verfügung gestellt. Die Konjugation erfolgte in Kooperation mit R. Wiewrodt, Medizinische Klinik III, Johannes-Gutenberg Universität Mainz.

Anti-PECAM-1 Antikörper und Katalase wurden mit NHS-LC Biotin biotinyliert und mit Neutravidin (NA) konjugiert wie beschrieben (Atochina et al., 1996; Muzykantov et al., 1996; Atochina et al., 1998; Atochina et al., 1998; Atochina et al., 1996)) Die Nanopartikel wurden zentrifugiert, um ungebundene Antikörper zu entfernen, dann in 1% bovinem Serum Albumin-PBS resuspendiert und für 20 sec mikrosoniziert (Muro et al., 2003b).

Der Durchmesser der Konjugate wurde anhand des sog. *Dynamic Light Scattering* (DLS) bestimmt. Mittels Laserlicht werden die winkelabhängigen Streuintensitäten gemessen und ihre Korrelationsfunktion berechnet. Aus der Relaxationskonstanten der Korrelationsfunktion kann man Rückschlüsse auf die Diffusionskonstante und daraus auf den Radius der Konjugate ziehen. Verwendet wurde ein BI-90Plus Partikelgröße-Analysegerät mit einem BI-9000-AT digitalen Autokorrelator (Brookhaven Instruments, Brookhaven, NY). Die detaillierte Beschreibung der Analyse der Partikelgröße ist der 2002 erschienenen Arbeit von Wiewrodt et al. zu entnehmen (Wiewrodt et al., 2002).

Für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Versuche wurde eine Partikelgröße von 200-300nm gewählt, da wie bereits beschrieben Nanopartikel dieser Größe mit hoher Effizienz in die Endothelzellen internalisiert werden. Das Verhältnis von Antikörper/Katalase : Neutravidin dieser Konjugate beträgt 1:1 bzw. 4 :1 (Abb. 3.1, 3.2). Es wurden Konjugate

mit dem Verhältnis 4:1 verwendet, da diese prozentual mehr Katalase pro Komplex enthalten.

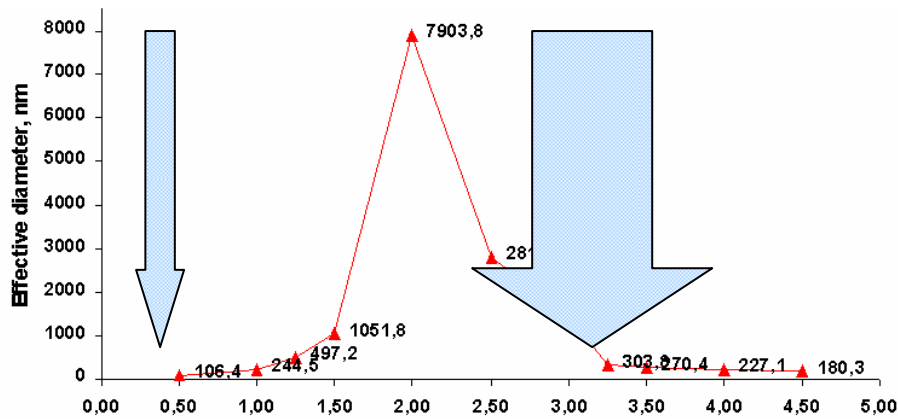


Abb. 3.1: Konjugatgröße und Internalisierungseigenschaften hängen ab vom molaren Verhältnis von Antikörper/Katalase : Neutravidin. Dargestellt ist das molare Verhältnis der Einzelkomponenten im Originalkonjugat. Konjugate mit einer Größe von 200- 300 nm weisen ideale Eigenschaften bezüglich Bindung an der Endothelzelle und Internalisierung auf (blaue Pfeile). In diesem Bereich beträgt das Verhältnis von Antikörper/NA zu Katalase 1:1 bzw. 4:1. (mit freundlicher Genehmigung von R. Wiewrodt, Mainz, 2003)

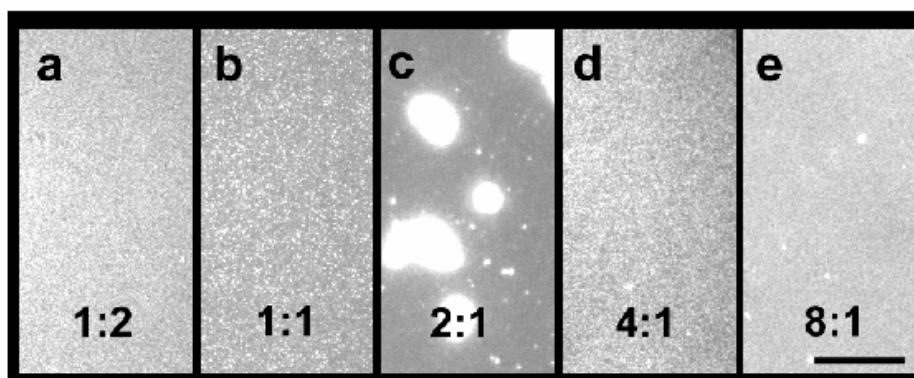


Abb. 3.2: Fluoreszenzmikroskopisch dargestellte Konjugatgröße in Abhängigkeit des Verhältnisses der Einzelkomponenten Antikörper/NA zu Katalase. Bei einem Verhältnis von 2:1(c) entstehen sehr große Partikel, die nicht internalisiert werden. Ideale Eigenschaften bezüglich Bindung und Internalisierung weisen Konjugate mit einem Verhältnis von 1:1 (b) bzw. 4:1 (d) auf. Der Balken in der Abbildung repräsentiert 10µm. (Wiewrodt et al., 2002)

3.2 Effekte der anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf den oxidativen Stress in kultivierten Endothelzellen in vitro

3.2.1 Zellen und Reagenzien

HUVECs (humane umbilikalvenöse Endothelzellen; Clonetics, San Diego, USA), wurden in M199 Medium (GibcoBRL, Grand Island, USA) mit 15% FBS, 2mM Glutamin, 15 µg/ml ECGS (endothelial growth supplement, GibcoBRL), 100µg/ml Heparin, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin kultiviert. Für die Versuche verwendeten wir konfluente HUVECs der 4.-5. Passage, die in 24 Well-Platten (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) ausgelegt wurden.

3.2.2 Ansätze

Humane Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC) wurden wie von Wiewrodt et al. (Wiewrodt et al., 2002) beschrieben 90min bei 37°C mit anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugaten (Herstellung siehe 3.1.2) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, um ungebundenes Konjugat zu entfernen. Anschließend wurden 2 mM H₂O₂ (Sigma, St. Louis, USA) und 0,9µg/ml anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat hinzugefügt. Als Kontrolle dienten HUVEC, die entweder nur mit 2 mM H₂O₂ oder nur mit 0,9µg/ml Konjugat inkubiert wurden.

3.2.3 Parameter

Zur Analyse der Effekte der anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf den durch H₂O₂ induzierten Endothelzellschaden wurden die Endothelzellen morphologisch analysiert. Als Parameter für den Zellschaden wurden insbesondere herangezogen eine Endothelzellretraktion, Vakuolisierung und Ablösung von der Oberfläche der 24-well Platte.

3.3 Effekte der anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf den Ischämie-Reperfusionsschaden und die Transplantatfunktion von NHBD-Spenderlungen in vivo

3.3.1 Tierhaltung

Das Tierversuchsvorhaben wurde nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, Marchioninistraße 15, 81377 München (Dir.: Prof. Dr. med. U. Pohl) durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten am experimentellen Modell der linksseitigen orthotopen Einzellungentransplantation an gesunden Schweinen. Eine detaillierte Beschreibung des operativen Vorgehens ist Abschnitt 3.3.2 zu entnehmen. Die Versuchstiere, deutsche Hausschweine beiderlei Geschlechts, stammten aus dem Lehr- und Versuchstiergut der Tierärztlichen Fakultät der LMU München, Hubertusstraße 12, 85764 Oberschleißheim. Die Tierhaltung erfolgte im Tierstall des Institutes für Chirurgische Forschung durch entsprechend geschultes Fachpersonal.

3.3.2 Operatives Vorgehen

3.3.2.1 Prämedikation und Narkoseführung

Bei allen Tieren erfolgte die Prämedikation durch die intramuskuläre Gabe von Atropinsulfat (Atropin[®], 0,05 mg/kg), Azeperon (Stresnil[®], 20 mg/kg) zur Sedierung und Ketamin (Ketavet[®], 50 mg/kg) zur Analgesie. Anschließend wurde die Narkose durch die intravenöse Gabe von Natriumthiopental (Narcoren[®], 1,2mg/kg/h) eingeleitet. Als Muskelrelaxans erhielten alle Tiere Pancuroniumbromid (Pancuronium[®], 0,4 mg/kg). Anschließend wurde eine Tracheotomie über eine mediane cervikale Längsinzision durchgeführt.

Nach der endotrachealen Intubation über das Tracheostoma erfolgte mit Hilfe einer Beatmungsmaschine (Servo 900, Siemens, Solna, Schweden) eine intermittierende positive Druck-Ventilation (IPPV). Das respiratorische Minutenvolumen (AMV) betrug 240 ml/kg bei einer Atemfrequenz von 12/Minute in Doppellungenventilation. Der positive end-expiratorische Druck (PEEP) wurde auf 5 cm/H₂O eingestellt und der fraktionelle inspiratorische Sauerstoff-Anteil (FiO₂) betrug 1,0. Neben der Doppellungenbeatmung konnte eine Einzellungenventilation (selektive Beatmung einer Lunge) mit Hilfe eines linksläufigen 37 F Doppellumentubus (Mallinckrodt Co., London, UK) nach Diskonnektierung der kontralateralen Lunge durchgeführt werden. Um das AMV in Einzellungenventilation konstant zu halten, wurde die Atemfrequenz hier auf 22/Minute erhöht.

Die Narkose wurde bis zum Versuchsende durch die kontinuierliche intravenöse Gabe von Natriumthiopental (Narcoren[®], 1,2mg/kg/h), Fentanyl[®] (0,05mg/kg/h) und Midazolam (Dormicum[®], 0,25mg/kg/h) fortgesetzt.

3.3.2.2 Operation der Spendertiere

Als Organspender dienten wie oben beschrieben regionale Hausschweine. Über eine laterale zervikale Inzision wurde den Tieren ein zentraler Venenkatheter (ZVK) in die rechte V. jugularis sowie ein arterieller Katheter in die A. carotis externa eingeführt und fixiert. Zusätzlich wurde ein Swan-Ganz-Katheter über eine 7 F- Schleuse in der linken V. jugularis in die A. pulmonalis eingeschwemmt und zur späteren Analyse der Hämodynamik mit einem REF-1 Cardiac Output-Computer (Baxter, Santa Ana, USA) verbunden.

Nach medianer Sternotomie wurde das Perikard inzidiert und der Thymus entfernt. Vor der operativen Präparation wurden 10.000 IE Heparin verabreicht. Im Anschluß wurde die V. cava superior isoliert und mit einem 2/0 Vicryl[®]-Faden (Fa Ethicon, Hamburg) angeschlungen. Der Truncus pulmonalis wurde von der Aortenwurzel abpräpariert. Am isolierten Truncus pulmonalis wurde eine Tabaksbeutelnaht mit einem 5/0 Prolene[®]-Faden (Fa. Ethicon, Hamburg) und einem Tourniquet vorgelegt.

Nach Laparotomie erfolgte die Präparation der Bauchaorta auf Höhe der Zwerchfellzwinde. Daraufhin wurde die Aorta abgeklemmt und im Anschluss daran die V. cava inferior mit einem 2/0 Vicryl[®]-Faden (Fa Ethicon, Hamburg) ligiert. Hierdurch konnte das perfundierte Gefäßbett auf ca. 50% verkleinert werden und ein möglicher Verlust des anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugats in der Peripherie vermieden werden.

Es erfolgte die Punktion der linken Pulmonalarterie mit einer Venenverweilkatheter zur kontinuierlichen Applikation des jeweiligen Wirkstoffes je nach Versuchsgruppe (s. Kapitel 3.4, Abb. 3.9) über einen Zeitraum von 5 Minuten. (Abb. 3.4.). Die Infusion von Konjugat und Gemisch erfolgte gelöst in Trägerlösung (2ml Glycerol auf 50ml NaCl). Nach einer 25 minütigen Zirkulationsphase erfolgte eine Stichinzision und Kanülierung des Truncus pulmonalis mit einem 24 F Perfusionskatheter für die spätere Flush-Konservierung. Der Perfusionskatheter wurde mit einem Tourniquet fixiert. Die V. cava superior wurde mit dem vorgelegten Faden ligiert und die Aortenwurzel mit einer Löffelklemme abgeklemmt. Eine schematische Darstellung des operativen Situs ist Abb. 3.4 zu entnehmen.

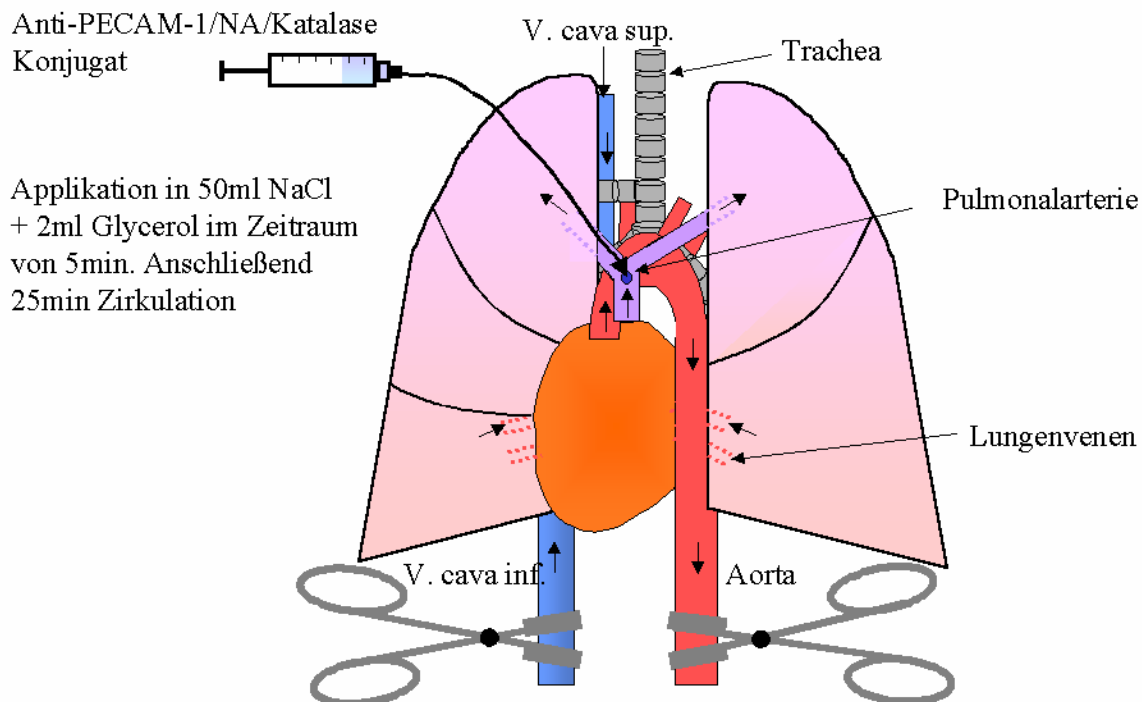


Abb. 3.4: Applikation des Wirkstoffs in die Pulmonalarterie des Spendertieres. Crossclamping von V. Cava inferior und Aorta subdiaphragmal zur Reduktion des Zirkulationsvolumens auf ca. 50%. Einzelheiten siehe Text S.32.

Die Induktion des Herzstillstands erfolgte durch Injektion einer 1 molaren Kaliumchlorid-Lösung (20 ml) in den linken Ventrikel. Darauf wurden die Lungen für 90 Minuten in situ belassen (Phase der warmen Ischämie) und weiter mit 100% O₂ und einer Atemfrequenz von 12/min beatmet (Begrenzung des inspiratorischen Beatmungsdrucks bei 40 cmH₂O, PEEP 5). Der Thorax wurde während der warmen Ischämie provisorisch mit Tuchklemmen verschlossen.

Nach einer warmen Ischämiezeit von exakt 90 Minuten wurden die Lungen mit 60 ml/kg hypothermer (4°C) LPD-Lösung (Perfadex®, XVIVO Transplantation Systems, Göteborg, Schweden) mit einem Perfusionsdruck von 50 cmH₂O über den Perfusionskatheter im Truncus pulmonalis flush-perfundiert und explantiert. Der in Inspiration exzedierte Herz-Lungenblock wurde in eine Schale mit hypothermer Ringer-Lösung gegeben. Die ex situ Präparation des Organblocks umfasste die Entfernung des Herzens und die isolierte Darstellung des linken Hauptbronchus, der linken A. pulmonalis sowie der linken Vorhofmanschette mit Mündung der Vv. Pulmonales. Anschließend wurden die Spenderlungen in Inspirationsstellung in Ringer-Lösung für ca. 18 Stunden bei 4°C gelagert (Tab. 3.1). Nur jeweils die linke Lunge des Spendertieres wurde tatsächlich transplantiert. Die rechte, ebenfalls flush-perfundierte und konservierte Lunge

(kontralaterale Spenderlunge, KL) wurde dagegen nicht transplantiert, sondern diente der Analyse der durch die warme Ischämie und anschließende kalte Lagerung entstandenen Veränderungen (Abb. 3.5).

Ischämie in h	Vehikel	Gemisch	Konjugat
n 1	18,3	18,66	18,5
n 2	18,08	17	18,5
n 3	18,3	18,5	18,25
n 4	18,3	18,16	18
n 5	18,66	18,66	18,25
n 6	18,08	18,16	18
Mittelwert	18,29	18,19	18,25
SEM	0,087	0,25	0,091

Tab. 3.1: kalte Ischämie (hypotherme Lagerung von Beginn der Flush-Konservierung bis zum Beginn der Implantation) der einzelnen Transplantationsgruppen in Stunden

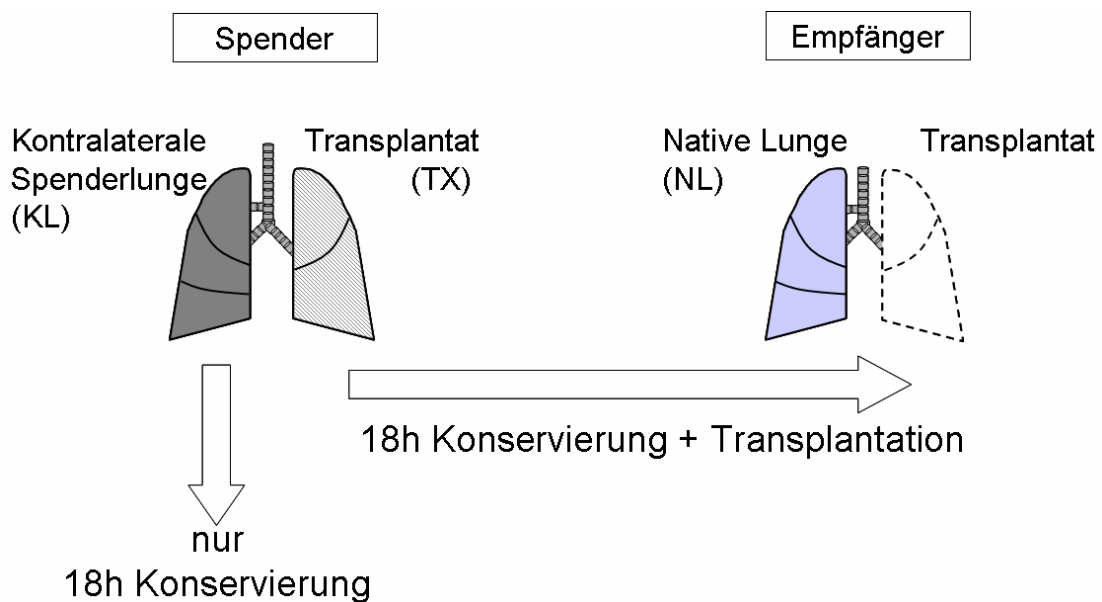


Abb. 3.5: Versuchsaufbau. Die Spenderlungen werden 18h kalt gelagert. Am folgenden Tag wird die linke Spenderlunge transplantiert, während die rechte Spenderlunge nicht transplantiert und unmittelbar nach der hypothermen Lagerung auf morphologische Veränderungen untersucht wird. Einzelheiten siehe Text S. 31-34.

3.3.2.3 Operation der Empfängertiere

Am folgenden Tag wurden gewichtsgleiche Empfängertiere prämediziert und narkotisiert. Die Intubation erfolgte bei allen Empfängertieren mit einem linksläufigen 35F Doppellumentubus (Mallinckrodt Co., London, UK). Die Katheterpräparation erfolgte identisch zu den Spendertieren (s. o.). Für das Monitoring der Urinausscheidung wurde über eine Minilaparotomie ein Blasenkatheter direkt in die Blase eingeführt und mit einer Tabaksbeutelnaht (Vicryl 3/0) fixiert. Die intravenöse Volumensubstitution während des operativen Vorgehens sowie in der Beobachtungsphase nach Reperfusion der Transplantatlunge erfolgte durch Infusion von 10-13 ml/kg/h Vollelektrolytlösung (Tutofusin®).

3.3.2.4 Pneumonektomie

In Rechtsseitenlage wurde bei den Empfängertieren eine linkseitige Thorakotomie durch den 4. Interkostalraum durchgeführt. Für die Pneumonektomie wurde die linke Lunge des Empfängertieres von der Beatmung diskonnektiert und in Atelektase belassen. Um den Unterlappen zu mobilisieren, wurde das Ligamentum pulmonale inzidiert. Die V. azygos wurde nahe dem linken Vorhof zwischen Overholt-Klemmen und Ligaturen (3/0 Vicryl) durchtrennt. Die obere und untere linke V. pulmonalis wurde zirkulär vom umliegenden Gewebe befreit und das lymphatische Gewebe vom linken Hauptbronchus und linken A. pulmonalis disseziert. Das dorsale Perikard wurde inzidiert, um die rechte A. pulmonalis abgangsnah darstellen zu können. Die rechte A. pulmonalis wurde anschließend mit einer Overholt-Klemme unterfahren und mit einer Gummibandligatur proximal des Abgangs der rechten Oberlappenarterie angeschlungen (Abb.3.6). Die Enden der Gummibandligatur wurden mit einem Tourniquet gefasst. Der linke Hauptbronchus wurde ebenfalls mit einer Overholt-Klemme unterfahren und mit einem Mersilene-Band angeschlungen. Auf diese Weise konnte der linke Schenkel des Doppellumentubus im linken Hauptbronchus sicher fixiert werden.

Vor dem endgültigen Absetzen der Gefäße wurden 10.000 IE Heparin intravenös verabreicht. Die Pneumonektomie erfolgte nach Durchtrennen der Vv. Pulmonales zwischen Overholtklemmen und Durchtrennen der linken A. pulmonalis nach Setzen einer abgangsnahen Bulldog-Gefäßklemme. Anschließend wurde der linke Hauptbronchus durchtrennt und die linke Lunge des Empfängers entfernt. Die Stümpfe der Vv. Pulmonales

des linken Lungenflügels wurden mit Ligaturen (Vicryl® 4/0) versorgt und die Overholt-Klemmen entfernt (Abb. 3.7).

3.3.2.5 Transplantation

Eine 120° Gefäßklemme wurde derart auf den linken Vorhof gesetzt, dass die laterale Kante des linken Vorhofs mit den ligierten Mündungsstellen der linken Lungenvenen außerhalb der 120° Klemme zu liegen kam. Die Ligaturen wurden mit der Schere entfernt. Die laterale Kante des linken Vorhofs wurde zwischen den eröffneten Gefäßstümpfen der Lungenvenen mit einer Pott-Schere eingeschnitten. Auf diese Weise wurde eine Manschette des linken Vorhofs für die Anastomosierung mit der Vorhofmanschette der Spenderlunge hergestellt.

Die orthotope Einzellungstransplantation der linken Lunge wurde mit der Bronchusanastomose begonnen. Anschließend erfolgte eine Anastomosierung der A. pulmonalis und der Vorhofmanschette. Alle Anastomosen wurden in fortlaufender Technik genäht. Für die Bronchus- und Vorhofanastomosen wurden 5/0, für die Anastomose der A. Pulmonalis 6/0 Prolene® Fäden verwendet. Vor dem Knoten des Fadens an der Pulmonalarterienanastomose wurde die Bulldog-Klemme von proximal nach distal der Anastomose der A. pulmonalis umgesetzt und der Blutstrom über die Anastomose freigegeben. Nach Dehnung der Anastomose auf den Bedarfsdurchmesser wurden die Fäden geknotet und somit eine iatrogene Stenosierung der Anastomose vermieden. Nach trachealem Absaugen und manuellem Blähen der Transplantatlunge wurde der Blutstrom über die A. pulmonalis komplett freigegeben. Nachdem durch die Reperfusion die Luft aus der Vorhofmanschette gespült wurde, wurde die Vorhofanastomose vollendet und die 120° Klemme vom linken Vorhof entfernt.

3.3.2.6 Schein-Operation

Bei den Tieren der schein-operierten Gruppe erfolgten die operativen Schritte zur Vorbereitung der Pneumonektomie analog dem Vorgehen bei den Empfängertieren in Rechtsseitenlage. Der Hilus wurde komplett denudiert und die pulmonalen Gefäße isoliert. Pneumonektomie sowie Transplantation wurden nicht durchgeführt.

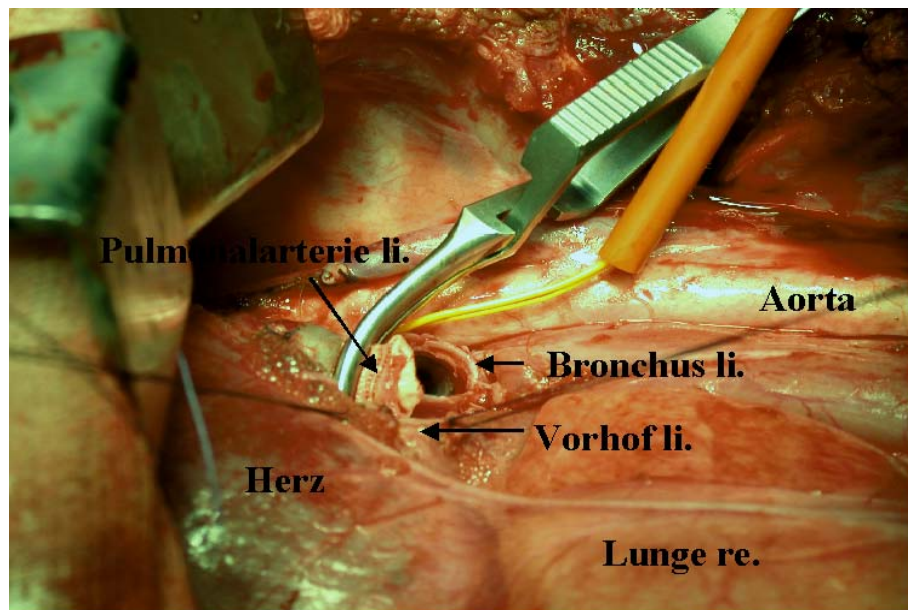


Abb. 3.6: Blick auf das linke Mediastinum eines Empfängertieres vor Implantation des Lungentransplantats in Rechtsseitenlage. Die native linke Lunge wurde explantiert. In der Klemme ist die linke Pulmonalarterie fixiert, im gelben Gummiband mit Tourniquet ist die rechte Pulmonalarterie angeschlungen.

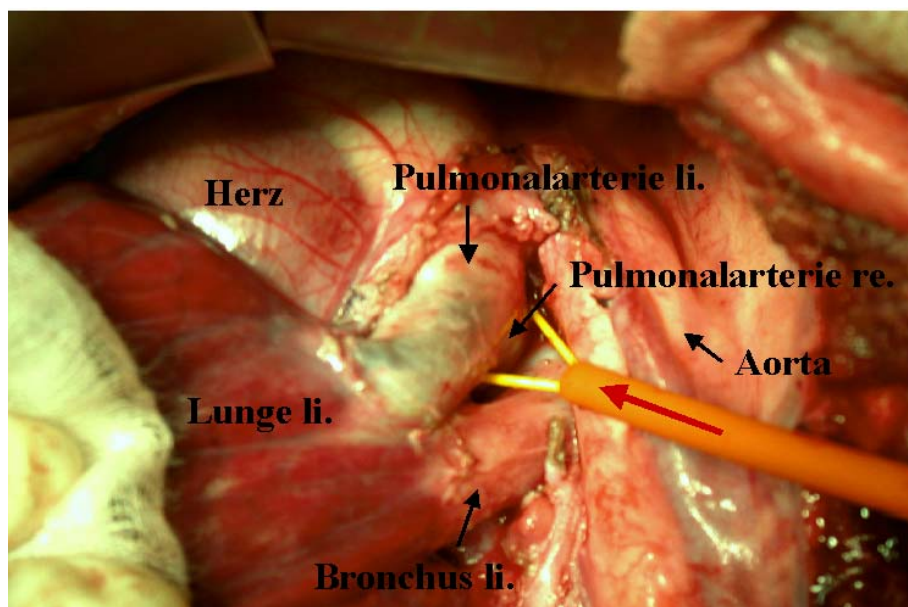


Abb. 3.7: Blick auf das linke Mediastinum eines Empfängertieres in Rechtsseitenlage nach Implantation. Die rechte Pulmonalarterie ist im Tourniquet angeschlungen. Durch Zuziehen des Tourniquet und gleichzeitig einseitiges Abklemmen des Doppellumentubus können die Lungen getrennt von einander beatmet werden. Einzelheiten siehe Text.

3.3.3 Parameter

3.3.3.1 Allgemeine Anmerkungen

Während einer Beobachtungsphase von insgesamt 6 Stunden nach Reperfusion der Transplantatlunge wurden stündlich zu definierten Zeitpunkten (s. Abb. 3.8) Parameter der Hämodynamik und des pulmonalen Gasaustauschs gemessen. Die Messungen wurden jeweils in isolierter Ventilation und Perfusion der Transplantat- bzw. der kontralateralen Nativlunge vorgenommen. Nach der letzten Funktionsuntersuchung wurden Gewebeproben für weitere Untersuchungen entnommen und die Empfängertiere anschließend in tiefer Narkose durch Applikation von 20 ml 1 molarer Kaliumchlorid-Lösung in den linken Ventrikel getötet.

3.3.3.2 Analyse des Blutbildes

Blutbildkontrollen erfolgten sowohl zum Beginn der Operation (Basalwert) als auch stündlich in der Reperfusionsphase (Abb. 3.8). Mit Hilfe eines Coulter Counter (Coulter Counter T 540, Fa. Coulter, Krefeld) erfolgten die Bestimmungen von Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hkt), Leukozytenzahl, Thrombozyten.

3.3.3.3 Hämodynamische Parameter

Der mittlere Arterielle Druck (MAP) wurde über einen arteriellen Katheter (Fa. Arrow, Reading, PA, USA), in Verbindung mit einem Satham Pressure-Transducer-System zusammen mit der Herzfrequenz mit Hilfe einer Hellige Recomed® Einheit (Fa Hellige Freiburg i. Br., FRG) registriert werden. Über den ZVK wurde der zentral-venöse Druck (ZVD) dokumentiert. Ein Swan-Ganz-Katheter (Criticath®, Thermodilution Catheter 7 F, Fa. Ohmeda, Erlangen, FRG) wurde nach Einschwemmen in die A. pulmonalis mit einem Satham Pressure-Transducer-System verbunden. Die Registrierung des mittleren pulmonal-arteriellen Drucks (MPAP) sowie des pulmonal-kapillären Verschlussdruckes (PCWP) erfolgte mit einer Hellige Recomed® Einheit. Das Herzminutenvolumen (Cardiac Output, CO) wurde mit Hilfe der Thermodilutionsmethode bestimmt. Die Registrierung der Temperaturänderung erfolgte über einen in der A. pulmonalis platzierten Swan-Ganz-Katheter (Criticath®, Thermodilution Catheter 7 F, Fa. Ohmeda, Erlangen, FRG), der mit

einem REF-1 CO-Computer (Fa. Baxter, Santa Ana, USA) verbunden wurde. Der systemische vaskuläre Widerstand (SVR) und der pulmonal-vaskuläre Widerstand (PVR) wurden wie folgt errechnet:

$$(1) \text{ SVR [dynes x sec x cm}^{-5}\text{]} = ((\text{MAP [mmHg]} - \text{ZVD [mmHg]}) / \text{CO [l/min]}) \times 79,9$$

$$(2) \text{ PVR [dynes x sec x cm}^{-5}\text{]} = ((\text{MPAP [mmHg]} - \text{PCWP [mmHg]}) / \text{CO [l/min]}) \times 79,9$$

Vor Sternotomie des Spendertieres bzw. vor Thorakotomie des Empfängertieres wurden nach Intubation und Insertion aller Katheter die Ausgangswerte für den mittleren arteriellen Druck (MAP), die Herzfrequenz (HF), Cardiac Output (CO), pulmonal-kapillären Verschlussdruck (PCWP) sowie der mittlere pulmonal-arteriellen Druck (mPAP) dokumentiert.

Weiter wurden alle hämodynamischen Parameter bei den Empfängertieren kurz nach Pneumonektomie vor Beginn der Implantation der Transplantatlunge sowie stündlich für insgesamt 6 Stunden nach Reperfusion der Transplantatlunge dokumentiert. Die Messungen wurden während der Beobachtungsphase beginnend ab 30 Minuten nach Reperfusion in Doppellungenventilation und – perfusion stündlich durchgeführt. Um die Transplantatfunktion beurteilen zu können, erfolgte 30min, 2, 4 und 6 Stunden nach Reperfusion die Messung der pulmonalen Hämodynamik der Transplantatlunge in isolierter Ventilation und Perfusion. Dazu wurden 5 Minuten vor Erfassen der hämodynamischen Parameter der rechte Schenkel des Doppellumentubus mit einer Schlauchklemme abgeklemmt und die rechte A. pulmonalis durch den vorgelegten Tourniquet okkludiert. Eine entsprechende Untersuchung der kontralateralen Nativlunge in isolierter Ventilation und Perfusion (Abklemmen des linken Schenkels des Doppellumentubus und Okklusion der linken A. pulmonalis durch eine Bulldog-Klemme) wurde 3 und 5 und 6 Stunden nach Reperfusion der Transplantatlunge durchgeführt (Abb.3.8).

Nach Messung der Hämodynamik in isolierter Ventilation und Perfusion erhielten die Tiere eine ausreichende Erholungsphase von 10 Minuten in Doppellungenventilation und – perfusion, bevor die Messung der kontralateralen Lunge erfolgte. Aus den erhobenen hämodynamischen Parametern wurde für jede Messung PVR und SVR der Transplantat- und Nativlunge errechnet.

3.3.3.4 Pulmonaler Gasaustausch

Die Blutgasanalyse heparinisierter Blutproben wurde mit Hilfe eines automatischen Analysegerätes (Superanalyzer, Fa. Anylex, Japan) durchgeführt. Das Gerät gibt für jede eingegebene Probe den Sauerstoffpartialdruck (PaO_2), Kohlendioxidpartialdruck (PaCO_2), Sättigung des Hämoglobins (SO_2), Base-Excess (BE), pH, Standardbicarbonat (HCO_3^-) sowie die Konzentration von Natrium (Na^+) und Kalium (K^+) an. Darüber hinaus wurde der Sauerstoffgehalt ($\text{C [Vol\%]} = 1,34 \times \text{Hb [g/dl]} \times \text{SO}_2 + (\text{pO}_2 \times 0,0031)$) der Blutproben automatisch errechnet. Blutproben für die arterielle (a) und gemischtvenöse (v) Blutgasanalyse wurden über den arteriellen Katheter bzw. den in der A. pulmonalis liegenden Swan-Ganz-Katheter entnommen.

Die intrapulmonalen Shuntfraktion (Q_s/Q_t), d.h. des Anteils des Herzzeitvolumens, welcher die Lunge passiert, ohne dabei oxygeniert zu werden wurde nach einer Formel für paO_2 -Werte >150 mmHg (Niemer M, 1992) wie folgt errechnet:

$$(1) \quad \text{Q}_s/\text{Q}_t = (\text{AaDO}_2 \times 0,0031) / \text{AvDO}_2 + (\text{AaDO}_2 \times 0,0031)$$

$$(2) \quad \text{AvDO}_2 \text{ (Arteriovenöse Sauerstoffgehaltsdifferenz)} = \text{CaO}_2 - \text{CvO}_2$$

$$(3) \quad \text{AaDO}_2 \text{ (Alveoloarterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz)} = \text{P(B)} - \text{P(H}_2\text{O)} - \text{paCO}_2$$

Ein niedriges Shuntvolumen weist dementsprechend auf eine homogene Durchblutung und eine intakte Mikrozirkulation in der Lunge hin. Um Analysen der Transplantatlunge in isolierter Ventilation und Perfusion durchführen zu können, wurden 5 Minuten vor Abnahme der Blutproben und Messung der hämodynamischen Parameter der rechte Schenkel des Doppellumentubus mit einer Schlauchklemme abgeklemmt und die rechte A. pulmonalis durch den vorgelegten Tourniquet okkludiert. Eine entsprechende isolierte Untersuchung der kontralateralen Nativlunge erfolgte durch Abklemmen des linken Schenkels des Doppellumentubus und Okklusion der linken A. pulmonalis durch eine Bulldog-Klemme. Das intrapulmonale Shuntvolumen (Q_s/Q_t) wurde sowohl für die Transplantatlunge, als auch für die kontralaterale Nativlunge bestimmt.

3.3.3.5 Dynamic Lung Compliance (C_{dyn})

Der Respirator (Servo 900, Siemens, Solna, Schweden) ermöglichte das Ablesen des AMV sowie des Atemwegsspitzendrucks (P_{vent}) bei eingestellter Atemfrequenz. Das Hubvolumen (V_T) errechnete sich aus dem AMV dividiert durch die Atemfrequenz. Aus Hubvolumen dividiert durch den Atemwegsspitzendruck wurde die dynamische Compliance der Lungen (C_{dyn}) folgendermaßen ermittelt:

$$C_{dyn} [ml/cmH_2O] = V_T [ml] / P_{vent} [cmH_2O]$$

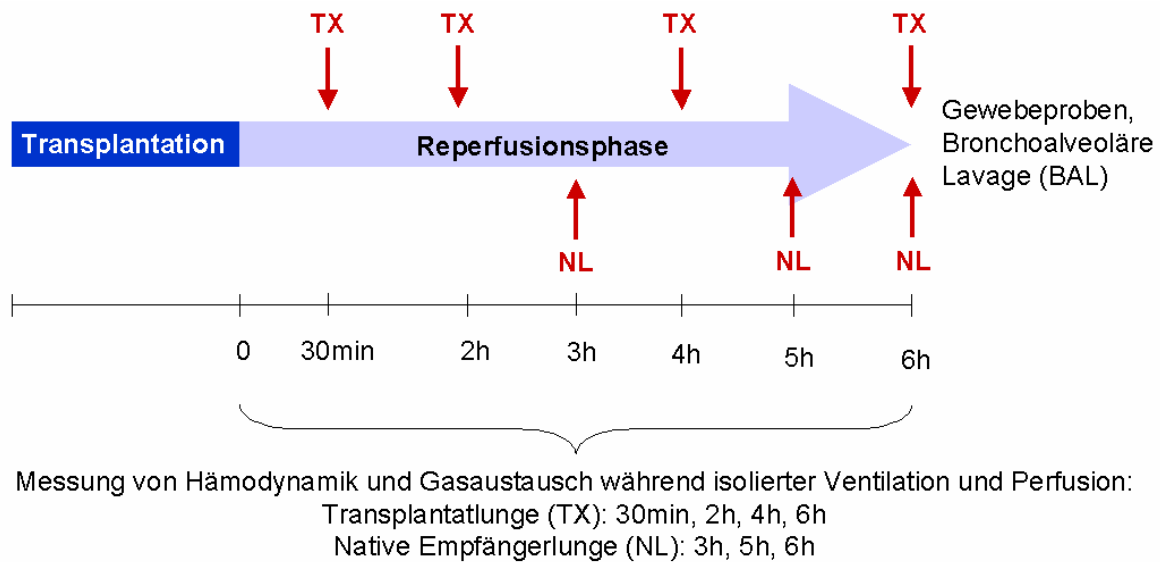


Abb. 3.8: Messprotokoll der Reperfusionsphase im Empfängertier. Die Basalwerte wurden unmittelbar nach Thorakotomie vor der Implantation bestimmt. 30 min, 2h, 4h und 6h nach Reperfusion erfolgte die Bestimmung der Parameter in isolierter Ventilation und Perfusion der TX-Lunge. An den Zeitpunkten 3h, 5h und 6h erfolgte analog die Bestimmung der Parameter in isolierter Beatmung und Perfusion der kontralateralen Nativlunge.

3.3.3.6 Morphologische Veränderungen

Wet/Dry Ratio

Der Quotient aus Feucht- und Trockengewicht repräsentiert den Flüssigkeitsgehalt in den entnommenen Gewebeproben und wurde zur Beurteilung der mikrovaskulären Permeabilitätsstörung herangezogen (Xiong et al., 1994). Jeweils eine Gewebeprobe des Oberlappens wurden zur Bestimmung des Feucht-/Trockengewichtsquotienten entnommen und sofort gewogen. Die Probeentnahme der rechten Spenderlunge (Kaltlagerungs-Lunge, KL) erfolgte unmittelbar nach der hypothermen Lagerung zum Zeitpunkt des Beginns der Implantation der Transplantatlunge. Nach Beendigung der Beobachtungsphase wurden die Tiere in Narkose getötet. Die Transplantatlunge und die Nativlunge wurden explantiert und die Anastomosen auf freie Durchgängigkeit überprüft. Anschließend erfolgte die Probenentnahme an der Transplantatlunge (TX) und der kontralateralen Nativ-Lunge (NL). Für die Entnahme der Gewebeproben wurde das zu entnehmende Gewebe mit großen Overholt-Klemmen abgeklemmt und anschließend mit dem Skalpell entlang der Overholt-Klemme reseziert. In der schein-operierten Gruppe konnten nur Gewebeproben von der linken (zur Vereinfachung ebenfalls TX genannt) und rechten Nativlunge gewonnen werden. Nach Trocknen für 72 Stunden bei 100°C wurden die Gewebeproben erneut gewogen und der mittlere Feucht-/Trockengewichtsquotient bestimmt.

Histologie

Gleichzeitig mit der Gewebeentnahme für den Feucht-/Trockengewichtsquotienten wurde jeweils eine Gewebeprobe des apikalen Oberlappens der Lungen für die histologische Untersuchung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) bzw. Chloracetatesterase entnommen.

Hämatoxylin-Eosin (HE)

Die Proben wurden sofort nach Entnahme in einer gepufferten 4% Formalinlösung fixiert. Nach Einbetten in Paraffin wurden 4 µm dünne Schnitte der Proben angefertigt und auf einen Objektträger aufgebracht. Die Paraffinschnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert (100%, 95%, 90%, 70% Ethanol, je 5 min). Die Blaufärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämatoxylin über 3 min. Das Bindegewebe wurde mit

Eosin über 3 min orangerot angefärbt. Anschließend wurden die Präparate wieder in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und nach entparaffinieren mit Xylol mit Entellan (Merck) eingedeckelt.

Chloracetatesterase

Die Lungenschnitte wurden wie beschrieben (Muller et al., 1999) gefärbt. Der Nachweis von Chloracetatesterase diente der quantitativen Detektion neutrophiler Granulozyten intraalveolär und interstitiell.

Für die Beurteilung der lichtmikroskopischen Beobachtungen in diesen Schnitten wurden die festgestellten morphologischen Veränderungen mit Hilfe eines semiquantitativen Score-Systems (Grad 0 = normal, Grad 1 = geringe, Grad 2 = mittelgradige und Grad 3 = hochgradige Veränderungen) eingeteilt (Muller et al., 1999). Bei der geblindeten histologischen Bewertung durch einen unabhängigen Pathologen (Fr. PD Dr. med. I. Bittmann, Institut für Pathologie der LMU-München) wurden folgende Parameter berücksichtigt (Muller et al., 1999):

- Endothelschaden
- Alveolardeckzell-Desquamation
- intraalveoläre Fibrinexsudation
- intraalveoläres und interstitielles Ödem
- Makrophagenakkumulation
- Leukozytenakkumulation am Endothel
- Zellnekrosen

3.3.3.7 Analyse der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)

Unmittelbar nach Entnahme der Gewebeproben wurden die Lungen explantiert und eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt. Hierzu wurde jeweils 100 ml 0,9% NaCl-Lösung über die Trachea in die Lungen instilliert und im Anschluß vorsichtig reaspiriert. Nach Bestimmung des prozentualen aspirierten Volumens (% Recovery-Rate) wurde die Lavageflüssigkeit (BALF) über eine doppelte Lage Gaze filtriert und bei 1500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert (Rotanta S Zentrifuge, Fa. Hettich, Tuttlingen, FRG). Ein Teil des gewonnenen Überstandes wurde bei -70°C eingefroren und später für die Analyse der Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) verwendet (s. u.).

Das entstandene Zellpellet wurde in 40 ml PBS-Lösung (Phosphate Buffered Saline) resuspendiert und erneut mit 1500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden für die Analyse der Zellvitalität, sowie zur Zelldifferenzierung verwendet.

Zellvitalität

Die Vitalität der gewonnenen Zellen wurde mit Hilfe von Trypanblau bestimmt. 100 µl der Zellsuspension wurden mit 50 µl 1%-Trypanblau (Fa. Fluka, Buchs, CH) auf einem Objektträger vermischt. Unter dem Lichtmikroskop wurde bei 40-facher Vergrößerung die Anzahl gefärbter Zellen (= avital) pro 100 Zellen ermittelt.

Die Bestimmung der absoluten Zellzahl erfolgte mit dem Coulter Counter (Coulter Counter T 540, Fa. Coulter, Krefeld). Zur morphologischen Differenzierung zwischen Alveolarmakrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten wurde die Zellzahl auf $4 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. 200 µl dieser Zellsuspension wurden mit der Cytospin-Zentrifuge (Fa. Standon, Frankfurt a. M.) für 5 Minuten bei 500 RPM auf einen Objektträger zentrifugiert. Die Zellen wurden mit der Methode nach Pappenheim gefärbt. Nach Trocknung des Präparates erfolgte die morphologische Differenzierung/100 Zellen (Mittelwert aus 3 HPF) unter einem Öl-Immersionmikroskop.

Zelldifferenzierung

Bei starker Verunreinigung der BALF mit Erythrozyten erfolgte zunächst eine kontrollierte Hämolyse durch Suspension des Zellpellets in Aqua dest. für 20 Minuten. Das osmotische Gleichgewicht wurde anschließend durch die Zugabe von 10 ml 1,8 % NaCl-Lösung wieder hergestellt. Das endgültige Zellpellet wurde in 3 ml 0.81% NaCl resuspendiert. Die Zellen wurden lichtmikroskopisch in Makrophagen, segmentkernige Leukozyten und Lymphozyten pro 100 Zellen differenziert.

3.3.3.8 Inflammation und oxidativer Stress

Myeloperoxidase Aktivität

Um die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) zu bestimmen, wurde nach dem von W. Kübler etablierten Protokoll verfahren (Kuebler et al., 1996): jeweils 100 mg Lungengewebe wurde homogenisiert und die entstandene Suspension 15 Minuten bei 4°C und 20 000 RPM in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1000µl HTAB Puffer (Hexadecyltrimethylammoniumbromid, Sigma, H-5882) resuspendiert. Nach 2 stündiger Inkubation im 60°C warmen Wasserbad wurden die Proben für 10 Sekunden soniziert um eine optimale Homogenisierung zu erreichen und anschließend bei -70°C eingefroren und wieder aufgetaut. Diese Arbeitsschritte wurden insgesamt 3mal wiederholt. Anschließend wurde die Suspension wiederum 15 Minuten bei 4°C und 20 000 RPM in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Im Überstand wurde die MPO-Aktivität mit einem Eppendorf-Photometer gemessen. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur (25°C) mit einer Wellenlänge von 691 nm bei einer Scheibergeschwindigkeit von 120mm/min über ca. 180 Sekunden.

Nach Kalibrierung des Gerätes und Festlegen des Nullpunktes wurden 150µl des MPO-Substrats Tetramethylbenzidin (TMB, Sigma T-2885) mit 150µl H₂O₂ vermischt und anschließend 300µl der Probenflüssigkeit dazu pipettiert. Nach raschem Verrühren mit einem Rührspatel wurde der Reaktionsverlauf vom Schreiber aufgezeichnet.

FACS-Analyse: Oxidativer Burst der Leukozyten

Für die Messung des oxidativen Burst wurden Zellen der Bronchoalveolären Lavage verwendet. Diese wurden auf 1 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt (Gewinnung s. o.). Die Analyse des oxidativen Burst mittels eines Fluoreszenz-activated Cell Sorters (FACS, Becton Dickinson) erfolgte unter Einsatz des Fluorochroms Dichlorofluoreszindiacetat (DCF). 4,85mg DCF (Serva 19353) wurden in 1ml Dimethylformamid (DMF, Sigma D-4254) gelöst. Diese Stammlösung wurde weiter 1:10 mit PBS verdünnt.

Zur Stimulation der Zellen wurde Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA, Sigma, P-8139) verwendet. 1mg PMA wurde in 1ml Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck 2931) gelöst. Diese PMA-Stammlösung wurde im Verhältnis 1:100 mit PBS verdünnt. Zu 250µl der eingestellten Zellsuspension wurden 50µl des gelösten DCF gegeben. Anschließend wurde die Lösung gut gemischt und 15 Minuten bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Danach wurden

50µl der verdünnten PMA-Lösung dazugegeben und wiederum 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt. Die Messung der Zellaktivierbarkeit erfolgte mittels FACS. Als Kontrolle dienten (1) Proben nur mit dem Zusatz von DCF, jedoch ohne PMA-Stimulation, sowie (2) Proben nur mit Zellsuspension ohne Zugabe von DCF als Leerwert.

Thiobarbitursäure reaktive Substanzen Assay (TBARS)

Die Konzentration der Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBARS) wurde mit einem Assay nach dem Protokoll von Hesse et al. (Hesse et al., 2004) untersucht: zur BALF wurde zur Denaturierung der Proteine 50µl 50% Trichloressigsäure (TCA, Sigma Chemie Deisenhofen) gegeben. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß umgefüllt und es wurden 75 µl 1,3% Thiobarbitursäure (TBA, Sigma Chemie, Deisenhofen) in 0.3% NaOH dazugegeben. Nach Inkubation für 1h bei 90°C und anschließendem Abkühlen in Eiswasser wurden die Proben 6 Minuten bei 3500 RPM zentrifugiert. Jeweils 200 µl der Proben wurden auf in eine 96-well Platte pipettiert und die Absorption bei 530nm mit einem Mikroplattenlesegerät (microplate reader, Dynex Technologies, Denkendorf) abgelesen. Die TBARS wurden entsprechend der Angaben des Herstellers unter Verwendung einer Malondialdehyd- Standardkurve quantifiziert (Fa. Sigma, Deisenhofen).

3.4 Experimentelle Gruppen

Für die experimentelle Bearbeitung der formulierten Fragestellungen wurden jeweils 6 Tiere pro Gruppe den verschiedenen Versuchsgruppen (Abb.3.9) durch Randomisierung zugeordnet:

Kontrollgruppe (n = 6)

Nach Präparation erfolgte die kontinuierliche Applikation der Vehikellösung 2ml Glycerol auf 50ml NaCl in die linke Pulmonalarterie der Spendertiere über einen Zeitraum von 5 Minuten. Nach einer 30-minütigen Zirkulationsphase wurde der Herztod induziert und die Lunge noch weitere 90 Minuten einer warmen Ischämie in situ ausgesetzt. Darauf wurde die Lunge mit 60ml/kg hypothermer (4°C) LPD-Lösung (Perfadex®, XVIVO Transplantation Systems,

Göteborg, Schweden) flush-perfundiert. Nach anschließender hypothermer Lagerung von 18 Stunden bei 4°C wurde jeweils der linke Lungenflügel in das Empfängertier transplantiert.

Gemischgruppe (n = 6)

In dieser Gruppe wurde nach Ende der Präparation ebenfalls in einem Zeitraum von 5min ein Gemisch aus den unkonjugierten Einzelsubstanzen biotinylierte Anti-PECAM-1 Antikörper und 0,1mg/kg KG Katalase, Neutravidin gelöst in der Trägerlösung (2ml Glycerol auf 50ml NaCl) in die linke Pulmonalarterie appliziert. Nach der 30-minütigen Zirkulationszeit wurde weiter wie in der Kontrollgruppe (s. o.) verfahren.

Konjugatgruppe (n = 6)

Im Unterschied zur Gemischgruppe erfolgte in der Konjugatgruppe nach Präparation die pulmonalarterielle Applikation des Konjugats aus anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugats mit 0,1mg/kg KG Katalase in Trägerlösung (2ml Glycerol auf 50ml NaCl). Analog zu den anderen Gruppen folgte eine 30-minütige Zirkulationsphase und daraufhin die Induktion des Herztodes mit anschließender 90-minütiger Ischämie in situ. Auch hier betrug die anschließende hypotherme Lagerung 18 Stunden.

Scheinoperierte Gruppe (n = 6)

Um den möglichen Einfluss der Denudierung des Lungenhilus auf die Lungenfunktion zu untersuchen, wurde in dieser Gruppe eine komplette Präparation des Lungenhilus durchgeführt, auf eine Pneumonektomie und Transplantation wurde jedoch verzichtet. (Abb. 3.9)

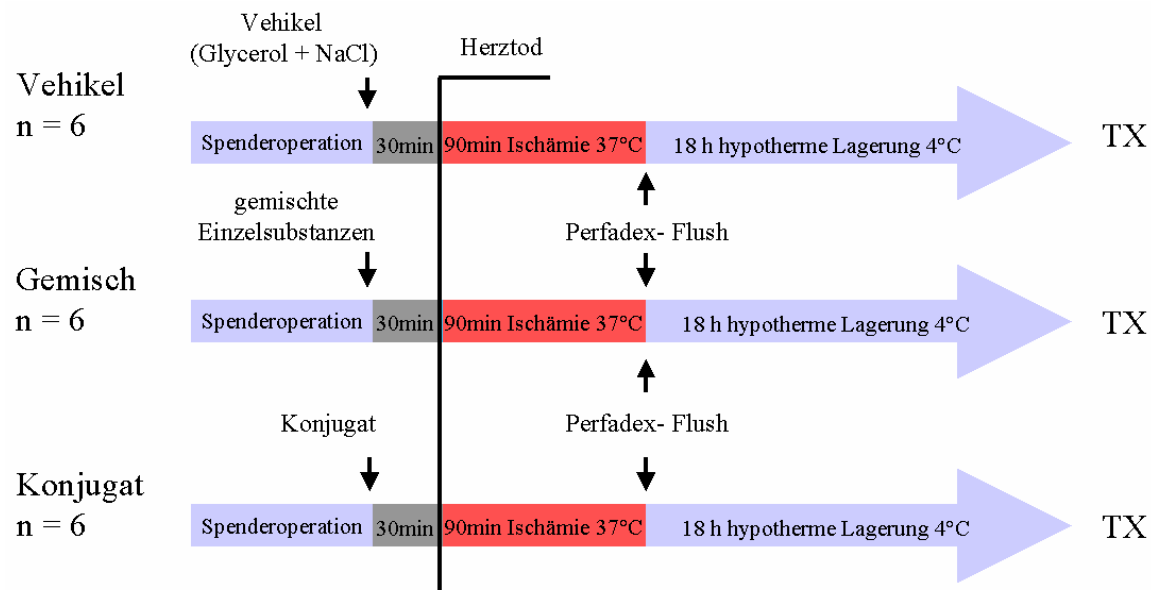


Abb. 3.9: Übersicht über das Studiendesign der experimentellen Gruppen. Nach Präparation des Spendertieres erfolgte die Applikation der jeweiligen Substanz. Darauf folgte eine 30-minütige Zirkulationszeit nach der der Herztod induziert wurde und das Transplantat 90 Minuten in situ verblieb. Nach der anschließenden Perfusion der Organe mit Perfadex folgte die Explantation. Danach wurden die Lungen 18 Stunden kalt gelagert. TX = Transplantation.

Die Versuchstiere wiesen bezüglich des Körpergewichts mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von $20,2 \pm 0,69$ kg bei Versuchsbeginn keine wesentlichen Unterschiede auf (Tab. 3.2a, 3.2b).

Spender	Vehikelgruppe	Gemischgruppe	Konjugatgruppe
Mittelwert	19,35	18,70	18,68
SEM	0,78	0,59	0,59

Tab. 3.2a: mittleres Tiergewicht der einzelnen Versuchsgruppen in kg, Spendertiere

Empfänger	Shamgruppe	Vehikelgruppe	Gemischgruppe	Konjugatgruppe
Mittelwert	19,02	21,68	21,07	19,05
SEM	0,44	1,25	1,17	0,58

Tab. 3.2b : mittleres Tiergewicht einzelnen Versuchsgruppe in kg, Empfängertiere

3.5 Statistik

Alle Werte wurden mit dem Programm Microsoft Excel® für Windows erfasst. Text und Tabellen wurden mit Microsoft Word® für Windows, Graphiken und Abbildungen wurden mit Microsoft Powerpoint® bzw. Adobe Illustrator und SigmaPlot® für Windows erstellt. Alle erhobenen Daten sind als Mittelwert (MW) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SigmaStat® für Windows. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mit dem One-Way-ANOVA-Repeated-Measures Test für die im Verlauf dargestellten Funktionsparameter der Lungenfunktion. Alle anderen Gruppenunterschiede wurden mit One-Way-ANOVA Test verglichen. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen wurde der Student-Newman-Keuls Test durchgeführt. Ermittelte Unterschiede der Parameter $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Auswirkungen der Transplantatvorbehandlung mit Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf den Organspender

Das zur Applikation der jeweiligen Substanz in die Pulmonalarterie des Spenders verwendete Vorgehen wurde bereits in Abschnitt 3.3.2.2 ausführlich dargestellt (Abb. 3.4). Hierbei war es erforderlich, Vena cava inferior und Aorta abzuklemmen um das Zirkulationsvolumen zu verkleinern und eine ausreichende Akkumulation des Konjugats in der Lunge zu gewährleisten. Um mögliche nachhaltige Auswirkungen des Abklemmens zu erfassen wurden zunächst Parameter des Gasaustausches und der Hämodynamik der Spendertiere analysiert.

4.1.1 Gasaustausch und Lungenfunktion

In Abbildung 4.1 ist der Sauerstoffpartialdruck zu basalen Bedingungen, sowie eine, bzw. 30 Minuten nach Abklemmen von V. cava inf. und Aorta dargestellt. Die Werte blieben über den gesamten Verlauf der Operation sowohl in der Vehikel-, als auch in der Gemisch- und Konjugatgruppe stabil und unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen.

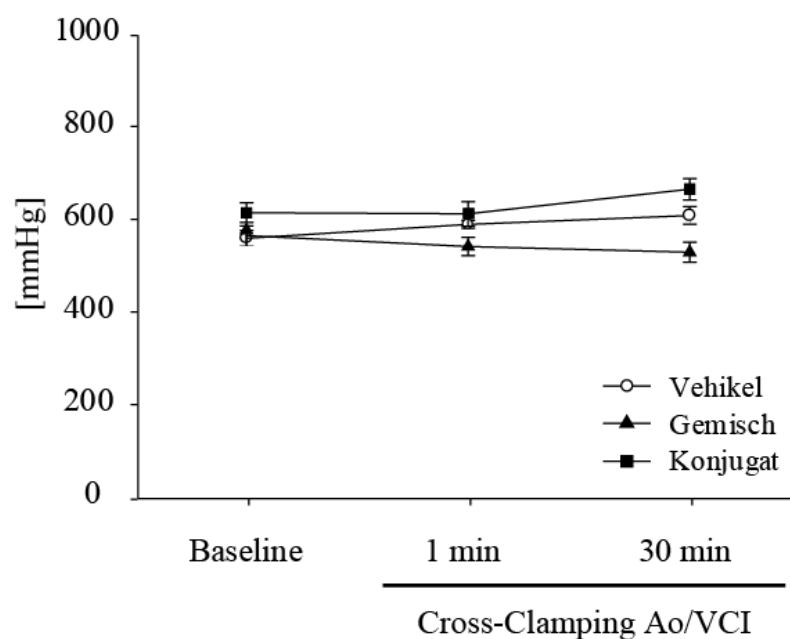


Abb. 4.1: PaO₂ des Spenders. Die Sauerstoffpartialdrücke blieben über den gesamten Operationsverlauf stabil, es bestanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

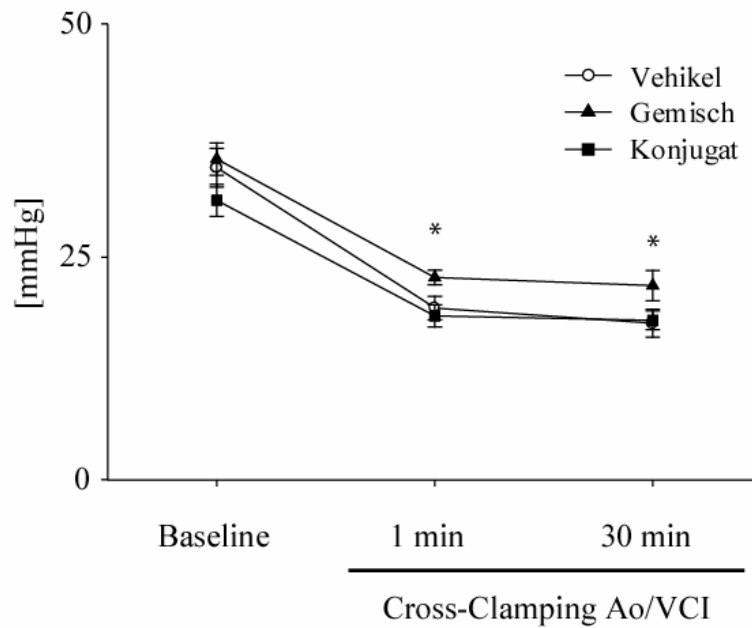


Abb. 4.2: PaCO₂ des Spenders. Nach einem initial signifikanten Abfall der CO₂ Partialdrücke gegenüber der Baseline blieben diese im weiteren Verlauf stabil, ohne Unterschiede zwischen den Gruppen zu zeigen. * P < 0,05 vs. Baseline.

Die CO₂ Partialdrücke (Abb. 4.2) fallen in allen drei Gruppen initial leicht ab und bleiben dann im weiteren Verlauf stabil. Es besteht ebenfalls kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

Als Parameter der Lungenfunktion diene zunächst die Bestimmung der sog. Dynamic Lung Compliance. Letztere ist ein Maß für die Elastizität der Lunge (Estenne and Kotloff, 2006) (Abb. 4.3). Die Applikation des Konjugats und das Abklemmen der Gefäße zeigten auch hier keinen negativen Einfluss. Die Werte sind konstant und unterscheiden sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen.

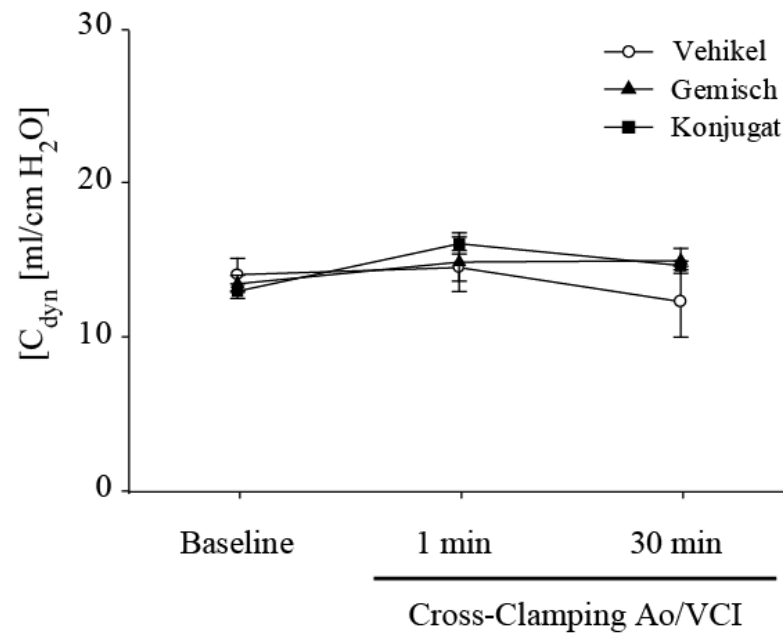


Abb. 4.3 : Dynamic Lung Compliance des Spenders. Die Werte waren über den gesamten Zeitraum konstant ohne Unterschiede zwischen den Gruppen.

4.1.2 Hämodynamik

Neben den Parametern des Gasaustauschs und der Lungencompliance analysierten wir den pulmonalen Gasaustausch. Der mittlere pulmonalarterielle Druck (mPAP) (Abb. 4.4), sowie der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) (Abb. 4.5) blieben während der gesamten Operation der Spender stabil.

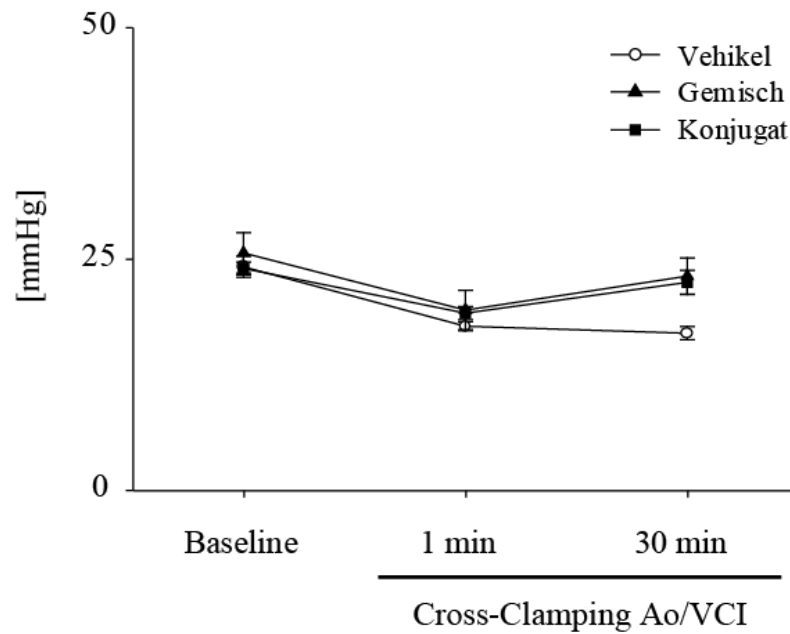


Abb. 4.4: Mittlerer pulmonalarterieller Druck (mPAP) des Spenders. Der mPAP blieb über den gesamten Verlauf stabil, ohne sich zwischen den Gruppen zu unterscheiden.

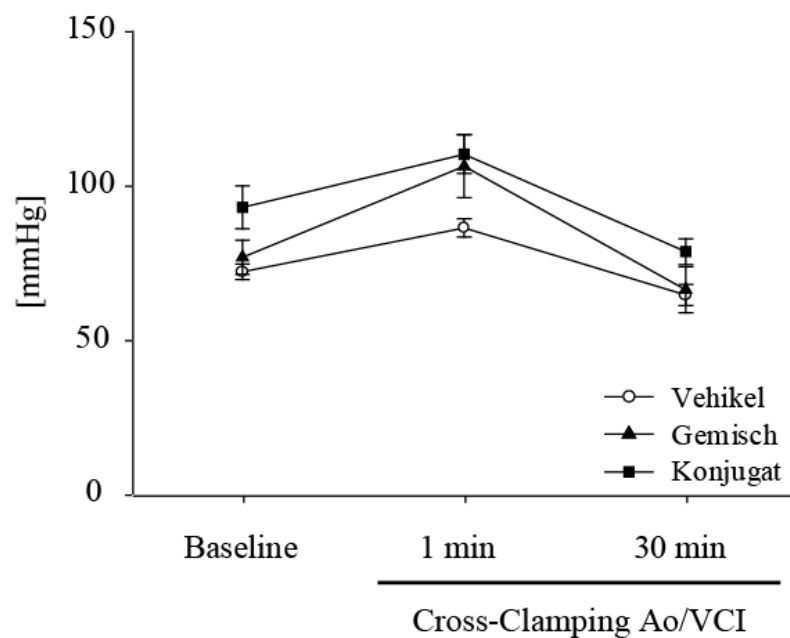


Abb. 4.5: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) Spender. Der MAP zeigte während der Operation keine signifikanten Veränderungen. Es bestanden keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

Das Herzzeitvolumen der Spendertiere fiel nach Abklemmen von V. cava inf. signifikant auf ca. 50% ab, während sich kompensatorisch die Herzfrequenz etwas erhöhte (nicht dargestellt). Bei beiden Werten bestand aber kein Unterschied zwischen Vehikel-, Gemisch- und Konjugatgruppe (Abb. 4.6).

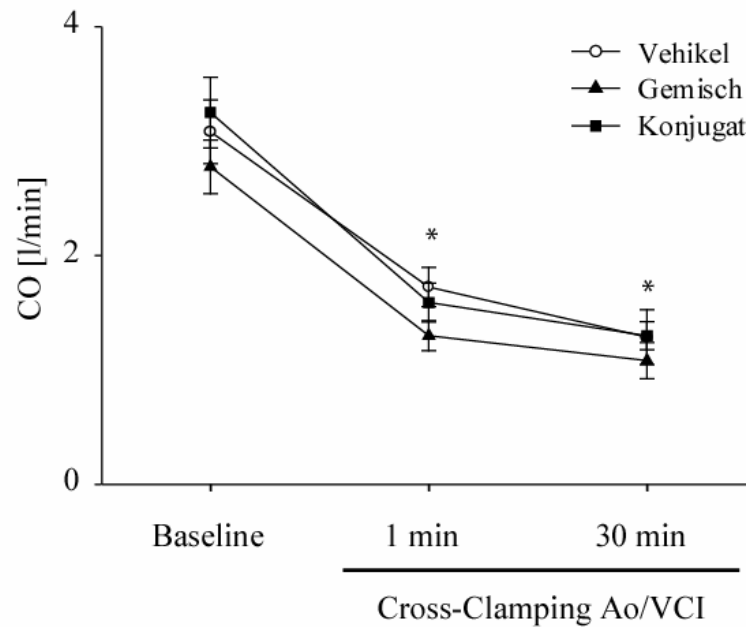


Abb. 4.6: Herzzeitvolumen (HZV) des Spenders. Nach dem Abklemmen von V. cava inf. Und Aorta fiel das HZV in allen Gruppen deutlich ab. Es bestanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen. * $P < 0,05$ vs. Baseline.

4.2 Effekte der Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf den Ischämie-Reperfusionsschaden und die Transplantatfunktion von NHBD-Spenderlungen in vivo

Nach Explantation und 18-stündiger Konservierung (s. Abb 3.5) erfolgte die Transplantation der linken Lunge in das Empfängertier. Der Implantation folgte eine 6-stündige Reperfusionsphase, in der die unten aufgeführten Parameter erhoben wurden. Durch die Möglichkeit der isolierten Ventilation und Perfusion der Lungen (siehe Material und Methoden) war es uns möglich, die Funktion der transplantierten Lunge unabhängig von der nativen Lunge des Empfängers zu analysieren.

4.2.1 Makrohämodynamik und Lungenfunktion nach Transplantation

4.2.1.1 Gasaustausch

Bei Beatmung mit einem FiO_2 von 1,0 zeigten scheinooperierte Tiere (Sham) über den gesamten Zeitraum stabile PaO_2 Werte um ca. 600 mmHg. Nach Transplantation fanden sich sowohl in der Vehikel-, als auch in der Gemischgruppe ein signifikanter Abfall der PaO_2 Werte. Dagegen zeigte sich in der mit Konjugaten behandelten Gruppe eine signifikante Verbesserung der PaO_2 Werte auf das Niveau der Sham-Gruppe (Abb. 4.7).

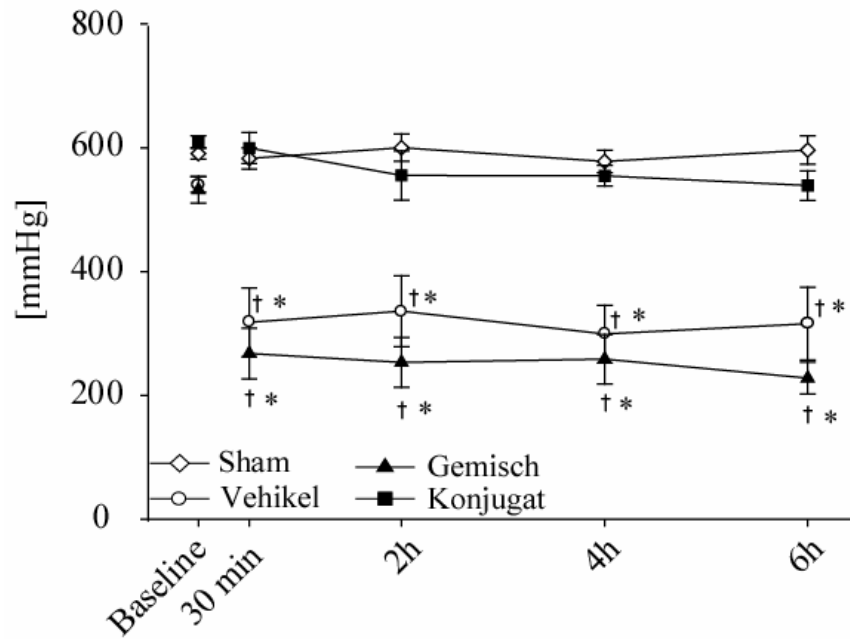


Abb. 4.7: Sauerstoffpartialdruck (PaO₂) des Transplantates bei einem FiO₂ von 1,0. Während sich nach Transplantation eine deutliche Abnahme der PaO₂-Werte in der Vehikel- und Gemischgruppe zeigte, stiegen die Werte in der Konjugatgruppe signifikant an bis auf das Niveau der scheinoperierten Gruppe (Sham). * $P < 0,05$ vs. Baseline, [†] $P < 0,05$ vs. Sham und Konjugat.

Bei der Untersuchung der CO₂-Partialdrücke fanden sich in der Sham-Gruppe durchwegs Werte um 35 mmHg (Abb. 4.8). Im Gegensatz dazu zeigten Vehikel- und Gemischgruppe eine CO₂-Retention die jedoch durch die Behandlung mit dem anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat normalisiert werden konnte.

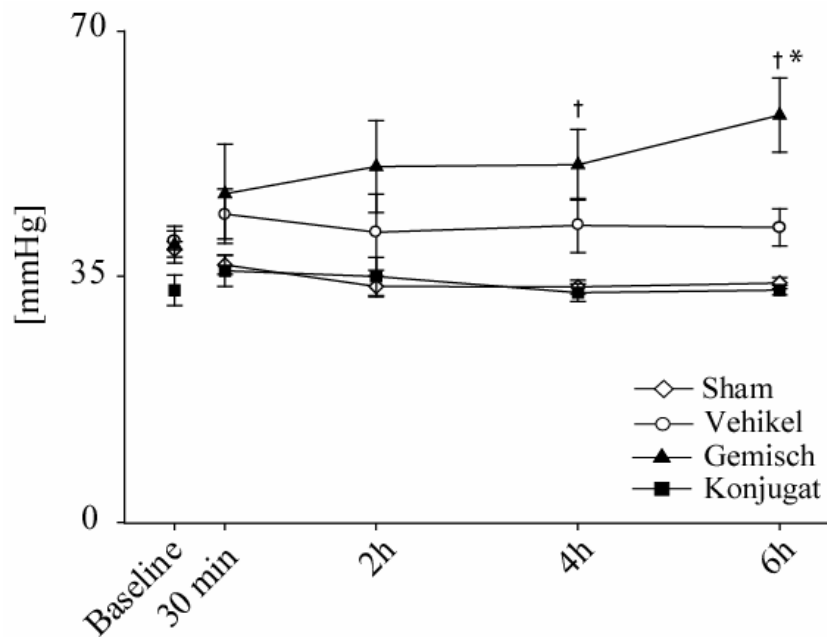


Abb. 4.8: CO₂-Partialdruck (PaCO₂) des Transplantates bei einem FiO₂ von 1,0. Die sowohl in der Vehikel-, als auch in der Gemischgruppe auffallende CO₂-Retention konnte durch die Vorbehandlung mit dem anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat normalisiert werden. † P < 0,05 vs. Sham und Konjugat. * P < 0,05 vs. Baseline

4.2.1.2 Pulmonale Shuntfraktion und Lungencompliance (Dynamic Lung Compliance, C_{dyn})

Zur weiteren Analyse der Lungenfunktion diente die Bestimmung der sogenannten pulmonalen Shuntfraktion (Q_s/Q_t), d.h. des Anteils des Herzzeitvolumens, welcher die Lunge passiert, ohne dabei oxygeniert zu werden.

Nach Transplantation kam es bei den mit Vehikel und Gemisch behandelten Tieren zu einer signifikanten Zunahme der pulmonalen Shuntfraktion. Durch Vorbehandlung des Transplantats mit dem Konjugat konnte dagegen eine signifikante Reduktion der Shuntfraktion erreicht werden und es zeigte sich kein Unterschied zwischen der Sham- und Konjugatgruppe (Abb. 4.9).

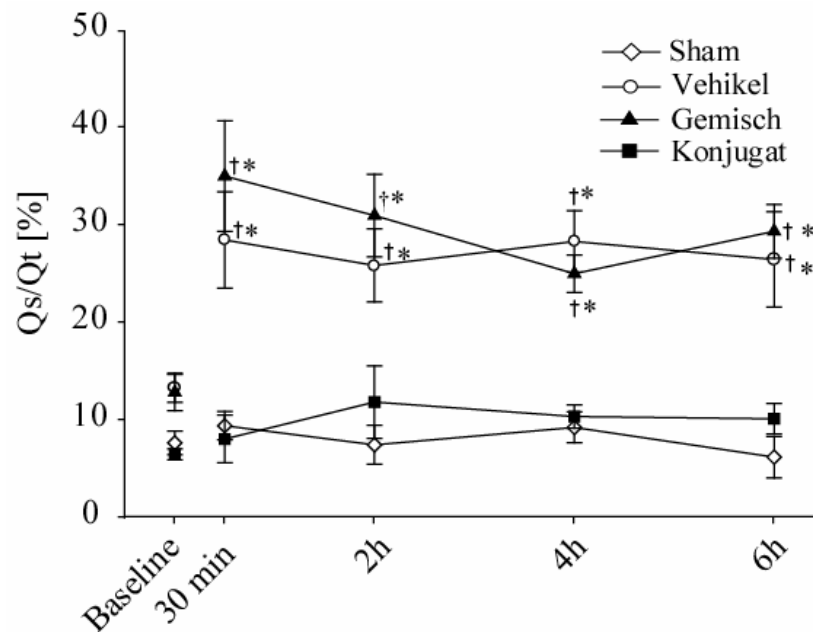


Abb. 4.9: Pulmonale Shuntfraktion im Transplantat. Nach Transplantation kam es in der Vehikel- und Gemischgruppe zu einer signifikanten Zunahme der pulmonalen Shuntfraktion. Durch Vorbehandlung des Transplantats mit dem Konjugat konnte eine signifikante Reduktion der Shuntfraktion erreicht werden. * $P < 0,05$ vs. Baseline, $^{\dagger}P < 0,05$ vs. Sham und Konjugat.

Als Maß für die Elastizität der Lunge diente die sog. *Dynamic Lung Compliance* (Abb. 4.10). In allen Transplantationsgruppen kam es nach Implantation durch Hilus-Denudierung zu einer signifikanten Abnahme der Compliance im Vergleich zu den basalen Werten. Dabei bestand kein Unterschied zwischen Vehikel-, Gemisch- und Konjugatgruppe. Allerdings war die Compliance in allen Transplantatgruppen signifikant niedriger im Vergleich zur Sham-Gruppe.

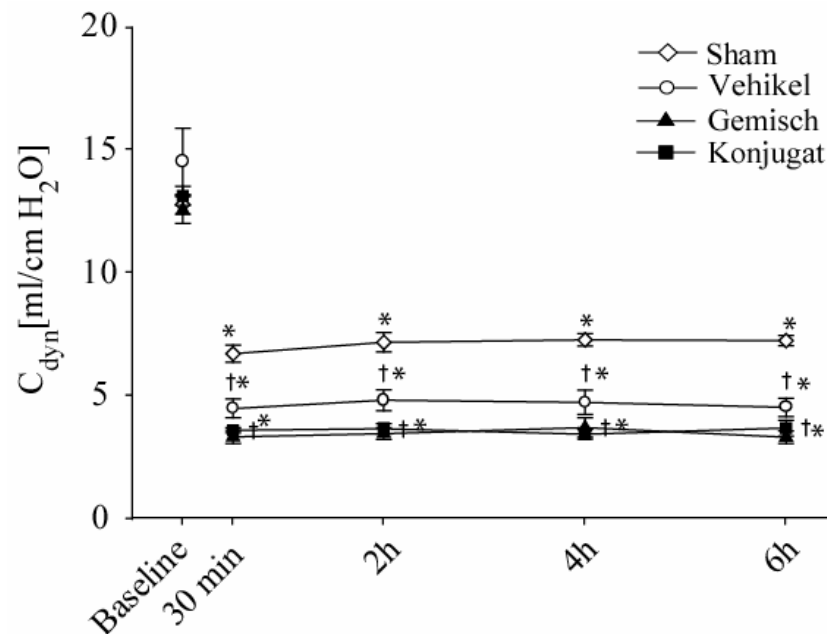


Abb. 4.10: Dynamic Lung Compliance des Transplantats. In allen Transplantationsgruppen kam es zu einer signifikanten Abnahme der Compliance im Vergleich zu den basalen Werten und der scheineroperierten Gruppe.

†P < 0,05 vs. Sham. * P < 0,05 vs. Baseline.

4.2.1.3 Hämodynamik

Neben den Parametern des Gasaustauschs und der Lungenfunktion ist auch die Hämodynamik des Empfängertieres von Transplantation und Vorbehandlung des Spenderorgans beeinflusst.

Der mittlere pulmonalarterielle Druck (mPAP) im Transplantat (Abb. 4.11) zeigte einen signifikanten Anstieg in allen drei Transplantationsgruppen im Vergleich zur Sham-Gruppe. Die Werte blieben während der gesamten Reperfusionphase stabil und unterschieden sich nicht zwischen Vehikel-, Gemisch- und Konjugatgruppe.

Ein zentraler Parameter zur Analyse der pulmonalen Hämodynamik ist der pulmonalvaskuläre Widerstand (PVR) (Abb. 4.12). Der PVR wurde jedoch durch die Konjugatbehandlung nicht wesentlich beeinflusst. Gegenüber den scheineroperierten Tieren kam es nach Transplantation zu einem signifikanten Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstands in allen drei Gruppen. Zwischen den Behandlungsgruppen zeigten sich keine Unterschiede.

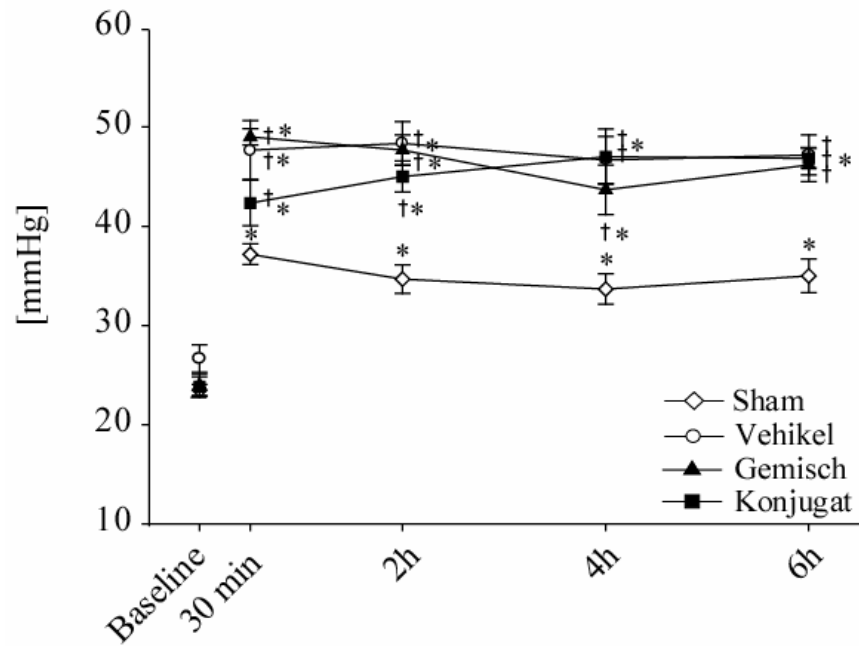


Abb. 4.11: Mittlerer pulmonalarterieller Druck (mPAP) nach Transplantation. Es kam zu einem signifikanten Anstieg des mPAP in allen Behandlungsgruppen gegenüber der Sham-Gruppe. * $P < 0,05$ vs. Baseline, † $P < 0,05$ vs. Sham.

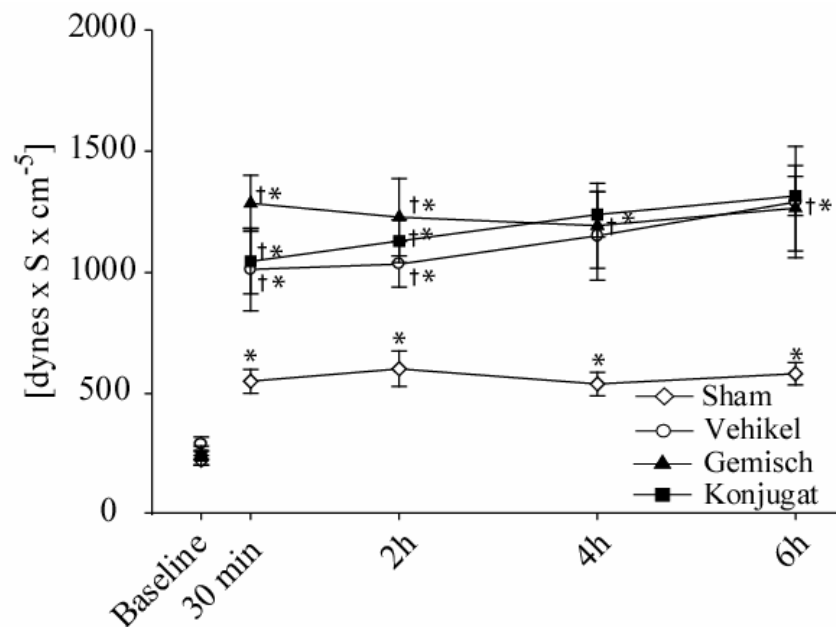


Abb. 4.12: Pulmonalvaskulärer Widerstand nach Transplantation. In allen drei Behandlungsgruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstands gegenüber der Sham-Gruppe. Zwischen den Behandlungsgruppen zeigten sich keine Unterschiede. * $P < 0,05$ vs. Baseline. † $P < 0,05$ vs. Sham.

Vergleichbar mit dem mPAP wurde der mittlere arterielle Druck (MAP) und die Herzfrequenz (nicht dargestellt) nicht von der Transplantation beeinflusst. Beide verhielten sich über den gesamten Zeitraum stabil und zeigten keinerlei Unterschiede, weder zwischen den Behandlungsgruppen, noch gegenüber den scheinoperierten Tieren (Abb. 4.13).

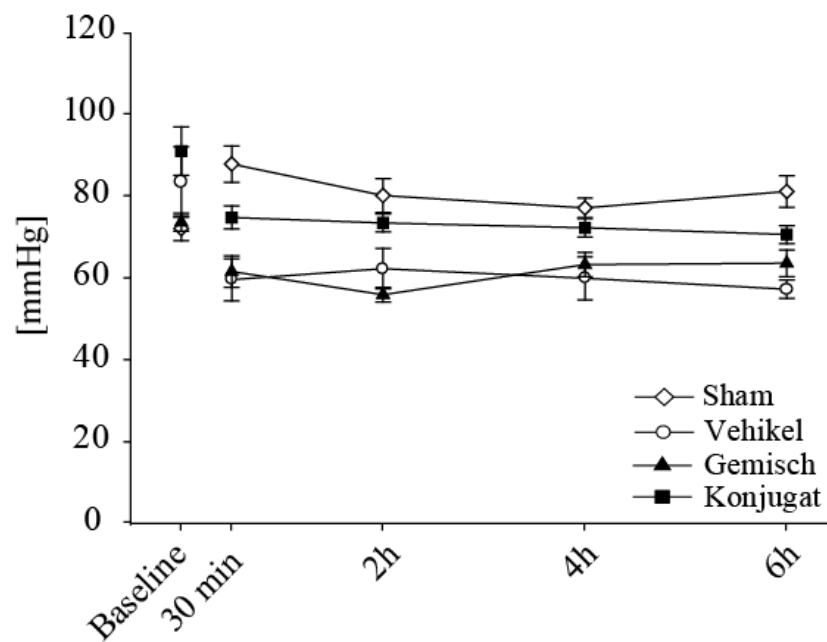


Abb. 4.13: Mittlerer arterieller Druck (MAP) im Empfänger bei isolierter Ventilation und Perfusion des Transplantats. Der MAP verhielt sich über den gesamten Zeitraum stabil ohne Unterschiede zwischen den Gruppen.

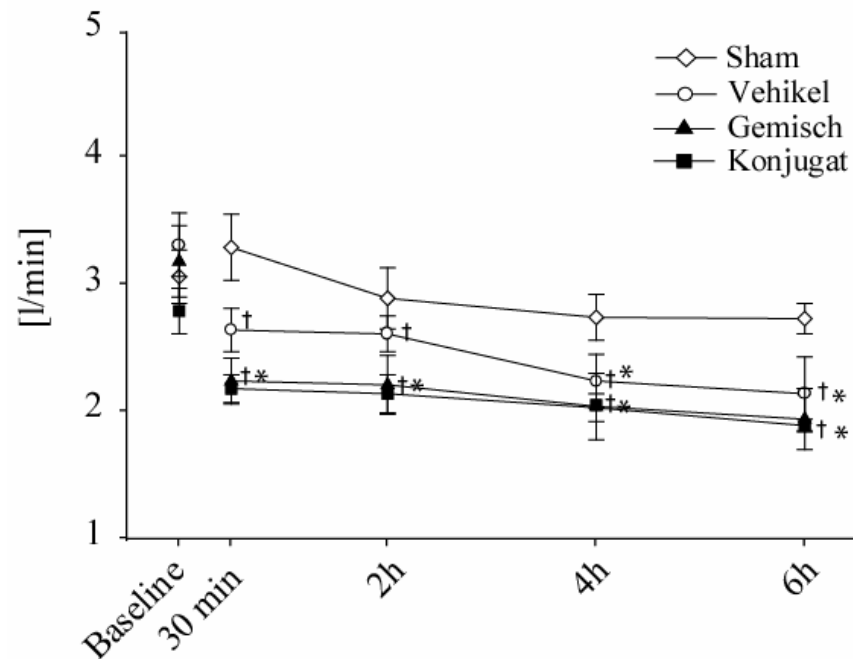


Abb. 4.14: Herzzeitvolumen im Empfänger nach Transplantation. Es zeigte sich ein deutlicher Abfall des HZV in allen transplantierten Gruppen gegenüber der scheinoperierten Gruppe. [†]P < 0,05 vs. Sham. *P < 0,05 vs. Baseline.

Die Transplantation wirkte sich dagegen auf das Herzzeitvolumen (HZV) aus. In Abb. 4.14 zeigte sich ein deutlicher Abfall des HZV in allen transplantierten Gruppen gegenüber der scheinoperierten Gruppe. In der Reperfusionsphase stabilisierten sich die Werte und zeigten keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen.

Die Spendervorbehandlung mit anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugaten führte zu einer signifikant besseren Oxygenierung des Transplantats bei einer deutlich verminderten CO₂-Retention und pulmonaler Shuntfraktion. Die pulmonale und systemische Hämodynamik wurde dagegen nicht beeinflusst. Neben Parametern zur Analyse der Lungenfunktion waren im Rahmen der hier dargestellten Untersuchung auch die morphologischen Veränderungen im Transplantat von Interesse.

4.2.2 Morphologische Veränderungen im Transplantat

4.2.2.1 Myeloperoxidase Assay

Da Leukozyten Myeloperoxidase (MPO) exprimieren, kann mit Hilfe eines MPO-Assays eine Quantifizierung der Leukozytenakkumulation im Lungengewebe durchgeführt werden. Nach Transplantation kam es bei allen Tieren zu einem Anstieg der MPO-Aktivität, d.h. zu einer vermehrten Leukozytenakkumulation im Transplantat im Vergleich zur Sham-Gruppe. Die jeweilige Vorbehandlung der Spender bewirkte bezüglich der MPO-Aktivität keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 4.15).

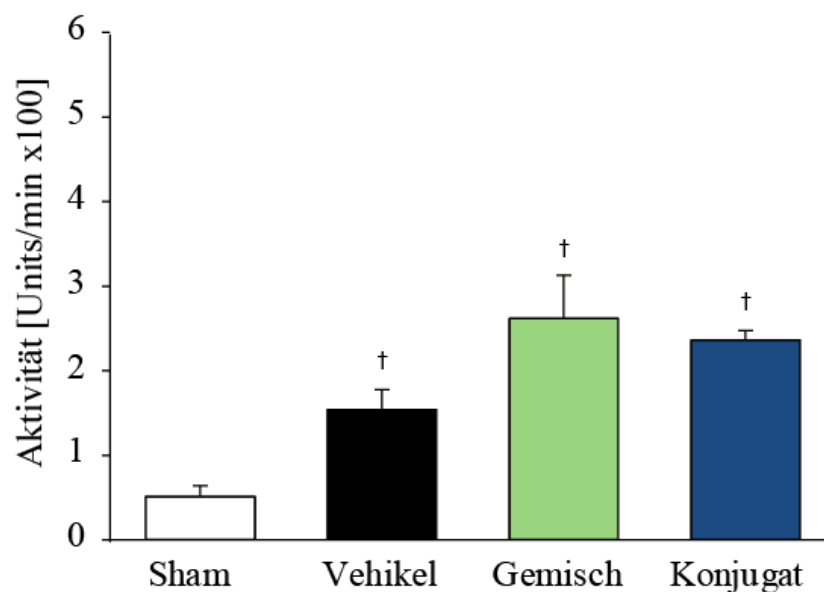


Abb. 4.15: Myeloperoxidase-Aktivität im Transplantat. Die jeweilige Vorbehandlung der Spender bewirkte keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der transplantierten Gruppen und der scheinoperierten Gruppe. [†]P < 0,05 vs. Sham.

4.2.2.2 Histologie

Zusätzlich zur MPO-Aktivität als indirekten Marker für Leukozytenakkumulation kann die Leukozytenrekrutierung im Transplantat auch direkt quantitativ bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl der sich intraalveolär befindenden Leukozyten ermittelt. Hierzu diente der Nachweis von Chloracetatesterase positiver Zellen in histologischen Schnitten der Lunge (Abb. 4.16, Abb. 4.17). Es kam nach Transplantation in allen drei Behandlungsgruppen zu einer Zunahme der Leukozyten in den Alveolen. Dabei unterschieden sich aber die mit Gemisch und Konjugat vorbehandelten Tiere sowohl von

den scheinoperierten, als auch von den nur mit Vehikel behandelten Tieren und zeigten eine deutlich höhere intraalveoläre Leukozytenzahl.

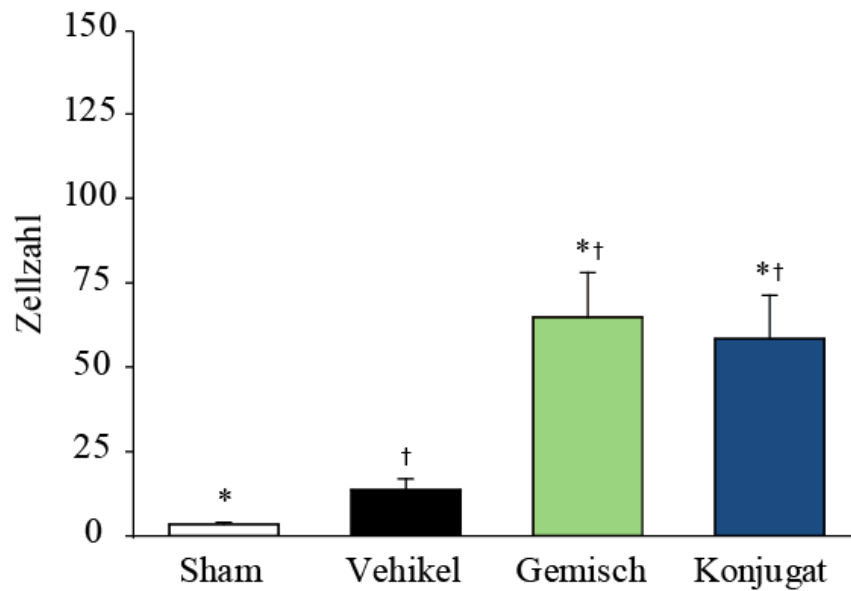


Abb. 4.16: Quantitative intraalveoläre Leukozytenrekrutierung mittels Nachweis Chloracetatesterase positiver Zellen. Alle transplantierten Tiere zeigten eine höhere Leukozytenakkumulation als die scheinoperierten Tiere. Dabei unterschieden sich die mit Gemisch und Konjugat behandelten Gruppen zusätzlich signifikant von der Vehikel-, bzw. Sham-Gruppe. * $P < 0,05$ vs. Vehikel, † $P < 0,05$ vs. Sham.

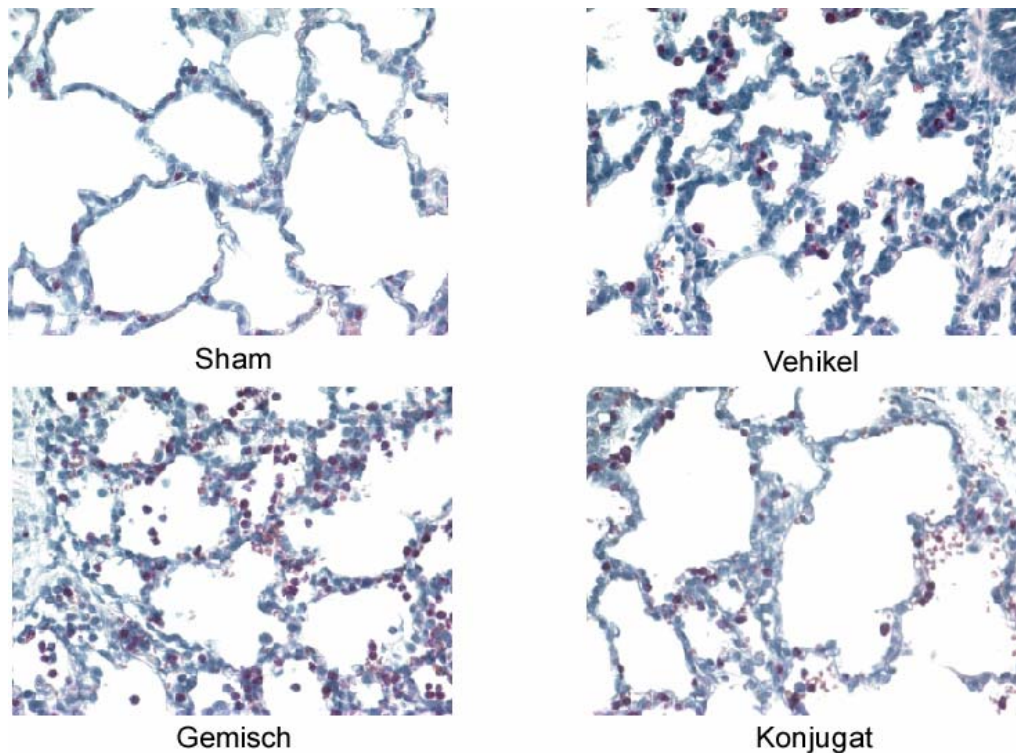


Abb. 4.17: Intraalveoläre Leukozytenakkumulation mittels Nachweis Chloracetatesterase positiver Zellen. Korrespondierend zur quantitativen Auswertung zeigten die Histologien von Gemisch- und Konjugatgruppe eine höhere Anzahl intraalveolärer Leukozyten. 40-fache Vergrößerung.

4.2.2.3 Analyse der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Um genauere Aussagen über das leukozytäre Infiltrat treffen zu können, wurden die Zellpopulationen in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) differenziert und die absolute Zellzahl von segmentkernigen Leukozyten, Makrophagen und Lymphozyten bestimmt. Nach Transplantation nahm bei allen Tieren die Anzahl der segmentkernigen Leukozyten zu. Es konnte keine Reduktion der Leukozytenrekrutierung durch die Spendervorbehandlung mit dem anti-PEACAM-1/NA/Katalase Konjugat gezeigt werden. Zwischen den Gruppen unterschied sich die Anzahl der Segmentkernigen nicht signifikant. Auch die Zahl der Alveolarmakrophagen und Lymphozyten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 4.18).

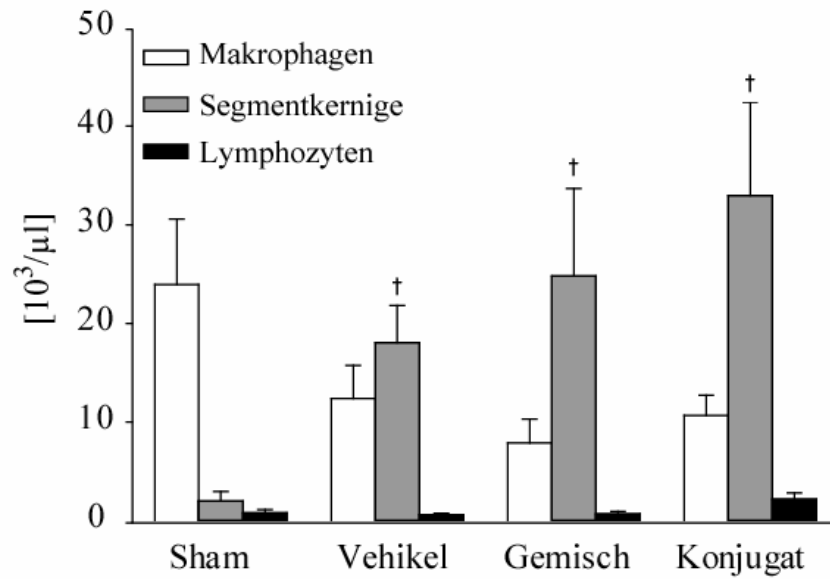


Abb. 4.18: Zytologie der Bronchoalveolären Lavage der Transplantatlunge. Nach Transplantation nahm die Anzahl der segmentkernigen Leukozyten zu. Innerhalb der Gruppen unterschied sich die Anzahl der Segmentkernigen jedoch nicht signifikant. Die Zahl der Alveolarmakrophagen und Lymphozyten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. †P < 0,05 vs. Sham.

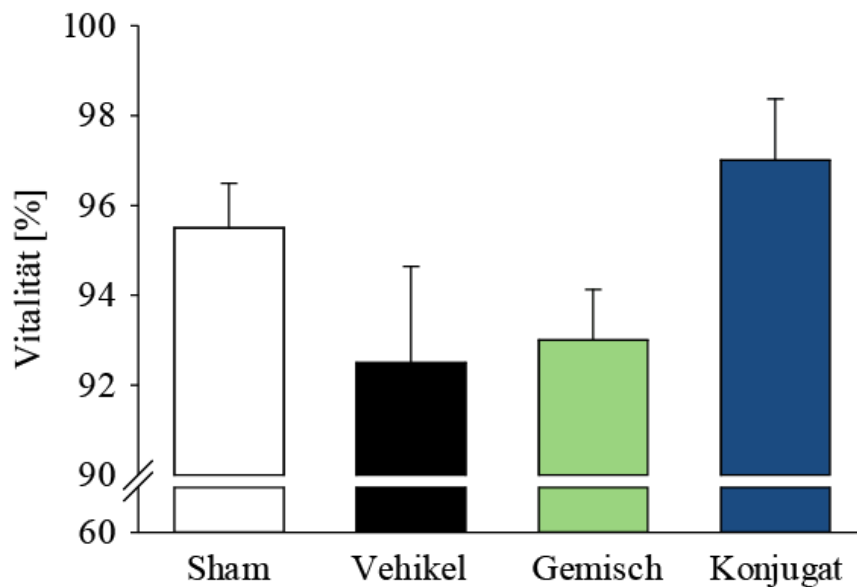


Abb. 4.19: Zellvitalität in der Bronchoalveolären Lavage des Transplantats. Die Vitalität lag in allen Gruppen deutlich über 90%. In der Sham- und Konjugatgruppe zeigen sich tendenziell die höchsten Werte.

Zusätzlich zur zytologischen Auswertung wurde in der BAL die Vitalität von Leukozyten und Alveolarmakrophagen untersucht (Abb. 4.19). Die Vitalität lag in allen Gruppen deutlich über 90% ohne jedoch signifikante Unterschiede zu zeigen.

4.2.3 Endothelfunktion im Transplantat

Das Endothel ist wie bereits beschrieben der primäre Schädigungsort des oxidativen Stresses im Rahmen des durch die warme Ischämie verstärkten Ischämie-Reperfusion-Schadens der *Non Heart Beating Donors*. Im Folgenden sollen daher die Effekte der Spendervorbehandlung auf die Endothelfunktion nach Transplantation analysiert werden.

4.2.3.1 Histologie

Der semiquantitative Score zur Beurteilung der histomorphologischen Veränderungen setzt sich, wie bereits beschrieben, aus verschiedenen Einzelkomponenten, wie z.B. Endothelschädigung, Ödembildung, Pneumozytenschädigung und Leukozytenakkumulation zusammen. Je höher der Score, desto ausgeprägter sind die pathologischen Veränderungen. Betrachtet man die Gesamtdarstellung für die Transplantationen (nicht dargestellt), zeigen sich in den transplantierten Behandlungsgruppen morphologische Veränderungen gegenüber den scheinoperierten Tieren.

Das Ausmaß der endothelialen Schädigung zeigte sich in der Entstehung eines interstitiellen und im weiteren Verlauf eines intraalveolären Ödems. Die Ödembildung nahm analog zur Endothelschädigung in der Vehikel- und Gemischgruppe zu. In der Konjugatgruppe konnte dagegen eine signifikante Reduktion erreicht werden: intraalveolär war in diesen Lungen kaum Ödem nachzuweisen. Bezüglich des Gesamtscores und des spezifischen Endothelschadens erreichten die Parameter jedoch nicht das Signifikanzniveau.

4.2.3.2 Wet/Dry-Ratio

Zusätzlich geht die Ödementstehung mit einer Gewichtszunahme des Transplantats einher, die sich mit Hilfe des Nass/Trocken Quotienten (Wet/Dry-Ratio) quantitativ erfassen lässt (Abb. 4.20). Es zeigte sich eine Zunahme des Flüssigkeitsanteils als Ausdruck des interstitiellen Ödems am Gesamtgewicht in allen transplantierten Gruppen. Trotz einer tendenziellen Verbesserung durch die Behandlung mit dem Konjugat konnte gegenüber anderen Gruppen kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

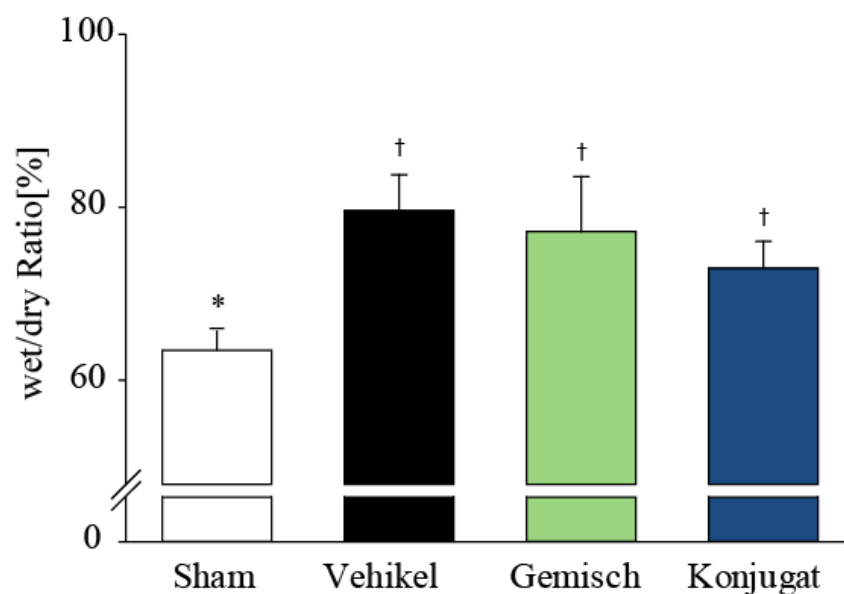


Abb. 4.20: Wet/Dry-Ratio der Transplantatlunge. Der Flüssigkeitsanteil am Gesamtgewicht ist in allen transplantierten Gruppen erhöht. Trotz einer tendenziellen Verbesserung durch das Konjugat vs. Vehikel- und Gemischgruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied. * $P < 0,05$ vs. Vehikel, † $P < 0,05$ vs. Sham.

4.2.4 Freisetzung von Sauerstoffradikalen

Zusammenfassend führte die Behandlung mit den anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugaten zu einer signifikanten Reduktion der nach Transplantation beobachteten Endothelzellschädigung und –dysfunktion und verminderte die intraalveoläre Ödembildung im Transplantat. Im nächsten Abschnitt untersuchten wir, inwieweit sich die Spendervorbehandlung den oxidativen Stress im Transplantat auswirkt.

4.2.4.1 Effekte der Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf den oxidativen Stress in kultivierten Endothelzellen

Zunächst analysierten wir den antioxidativen Effekt des Konjugats auf kultivierte humane Umilikalvenenendothelzellen (HUVECs) *in vitro*. Zur Induktion eines oxidativen Stresses wurden HUVECs für 5 Stunden mit 2mM H_2O_2 inkubiert. Die Abbildungen zeigen die Zellen nach 5-stündiger Inkubation (Abb. 4.21). Gegenüber intakten Endothelzellen nach Inkubation im Medium als Kontrolle imponierte nach Zugabe von H_2O_2 eine deutliche Endothelzellschädigung mit geschrumpften und zum Teil vakuolisierten Zellen. Deutlich sichtbar ist dagegen, dass die Zugabe des Konjugats die HUVEC vor der oxidativen Schädigung durch H_2O_2 schützte. Die alleinige Zugabe des Konjugats ohne nachfolgenden oxidativen Stress hatte dagegen keinerlei negativen Einfluss auf die Endothelzellmorphologie *in vitro*.

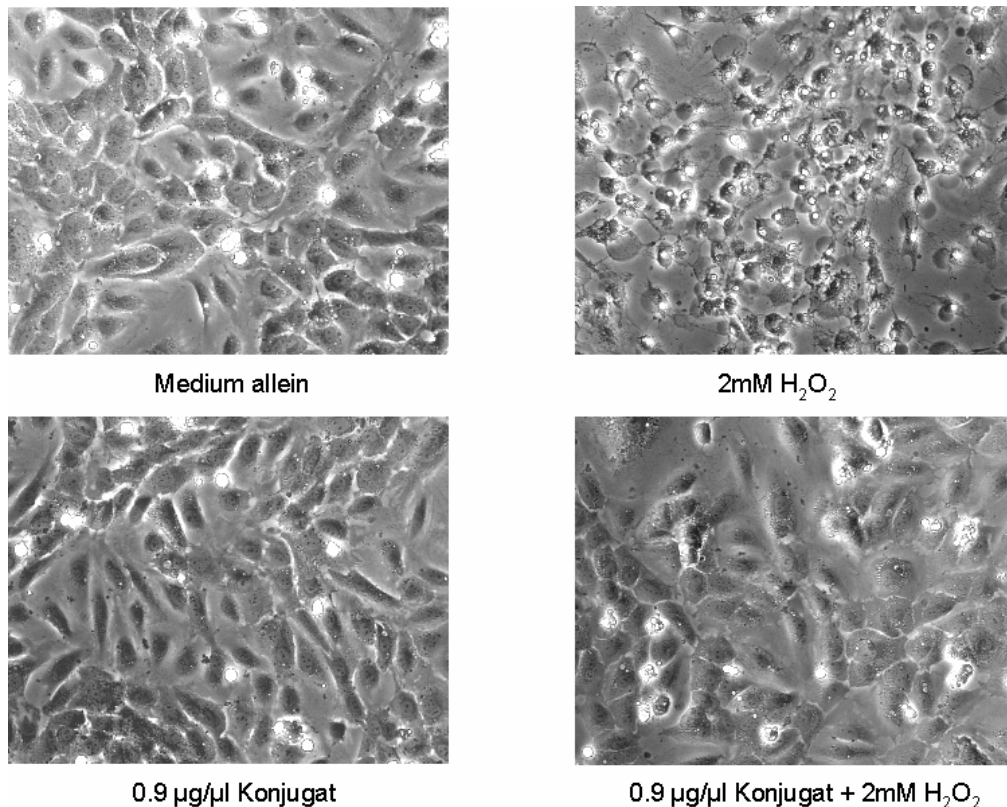


Abb. 4.21: HUVECs nach 5-stündiger Inkubation mit 2mM H₂O₂ und 0,9µg/µl anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat. Nach Zugabe von H₂O₂ imponierte eine deutliche Schädigung(kleine, geschrumpfte Zellen) der Endothelzellen (rechts oben). Die Zugabe des Konjugats konnte die Zellen vor der oxidativen Schädigung durch H₂O₂ schützen (rechts unten). 20-fache Vergrößerung.

4.2.4.2. Lipidperoxidation: Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS)

In vitro das anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat also in der Lage, Endothelzellen vor oxidativen Schäden zu schützen. Im nächsten Abschnitt untersuchten wir daher die Effekte des Konjugats auf die oxidative Zellschädigung in vivo. Als in vivo Parameter für den oxidativen Zellschaden dienten die Bestimmung der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF). Sie stellen ein Maß für die durch Sauerstoffradikale verursachte Lipidperoxidation dar.

Nach Transplantation kam es nur in der Vehikelgruppe zu einem signifikanten Anstieg der TBARS gegenüber der Shamgruppe. Die TBARS in der Gemisch und Konjugatgruppe unterschieden sich dagegen nicht signifikant von der Shamgruppe (Abb. 4.22). Anti-PECAM-1 und Katalase sind daher sowohl in Konjugatform, als auch als Einzelsubstanzen in der Lage, die Lipidperoxidation nach Lungentransplantation zu reduzieren.

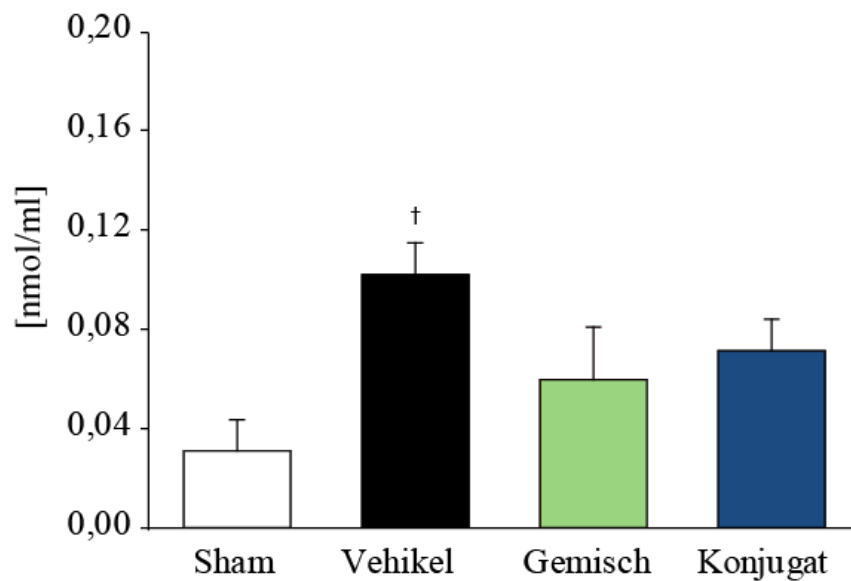


Abb. 4.22: Lipidperoxidation im Transplantat. In der Vehikelgruppe kam es zu einem signifikanten Anstieg der TBARS gegenüber der Shamgruppe. Die TBARS in der Gemisch und Konjugatgruppe unterscheiden sich dagegen nicht signifikant von der Shamgruppe. [†]P < 0,05 vs. Sham.

4.2.4.3 Oxidativer Burst der Leukozyten

Eine Hauptquelle reaktiver Sauerstoffmetaboliten stellen im Transplantat rekrutierte, aktivierte Leukozyten dar. Zur Quantifizierung der Effekte der anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf die leukozytäre Radikalproduktion in vivo analysierten wir daher den oxidativen Burst in Leukozyten der BALF. Die spontane Radikalproduktion der PMN wurde mit Dichlorofluorezein (DCF) bestimmt und zeigte keinen Gruppenunterschied (Abb. 4.23). Auch nach Stimulation mit PMA zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Demgegenüber zeigte die Vehikel- und Gemischgruppe eine reduzierte Stimulierbarkeit.

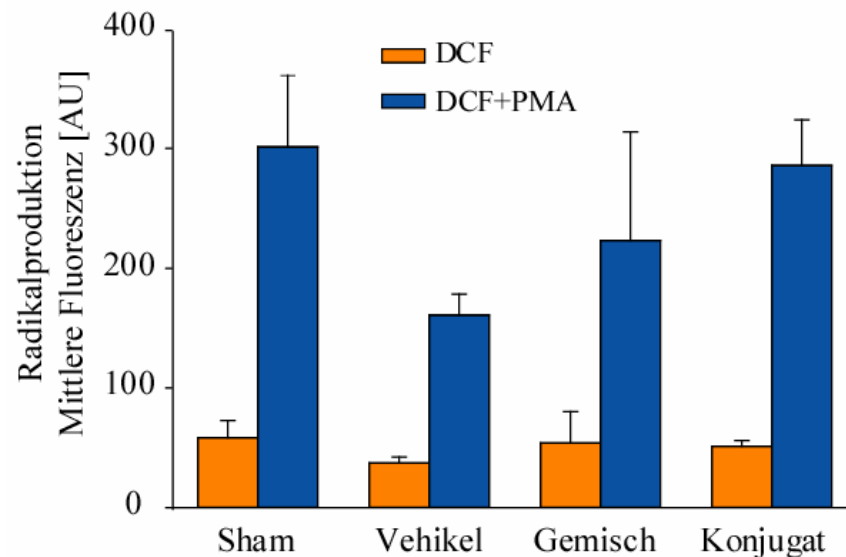


Abb. 4.23: Oxidativer Burst der Leukozyten im Transplantat. Leukozyten der Konjugatgruppe zeigten eine gegenüber den übrigen Gruppen eine tendenziell höhere Aktivierbarkeit der leukozytären Radikalproduktion.

4.3 Effekte der Anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate auf die morphologische Veränderungen durch Konservierung der Lunge (KL)

Wie eingangs beschrieben (siehe Kapitel 1.5) setzt sich der Transplantatschaden aus den Auswirkungen der warmen Ischämie mit anschließender hypothermer Konservierung, sowie aus den Effekten der nachfolgenden Reperfusion zusammen.

Nach den Ergebnissen für die Transplantatlunge soll in diesem Abschnitt dargestellt werden, wie sich die Vorbehandlung der Spender auf morphologische Veränderungen der Lunge nach alleiniger warmer Ischämie und Konservierung auswirkt. Hierzu wurde die rechte Spenderlunge analysiert, die nicht transplantiert, sondern nach der warmen Ischämie nur hypotherm gelagert wurde (siehe Abb. 3.5). Bei diesen Lungen wurden direkt nach der 18-stündigen Konservierung die BALF und Gewebeproben entnommen.

4.3.1 Analyse der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die BALF der konservierten Lungen wurden analog zu den Transplantatlungen untersucht. Hier zeigte sich keine signifikante Veränderung der absoluten Anzahl der segmentkernigen

Leukozyten. Auch bezüglich der Alveolarmakrophagen und Lymphozyten bestanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 4.24).

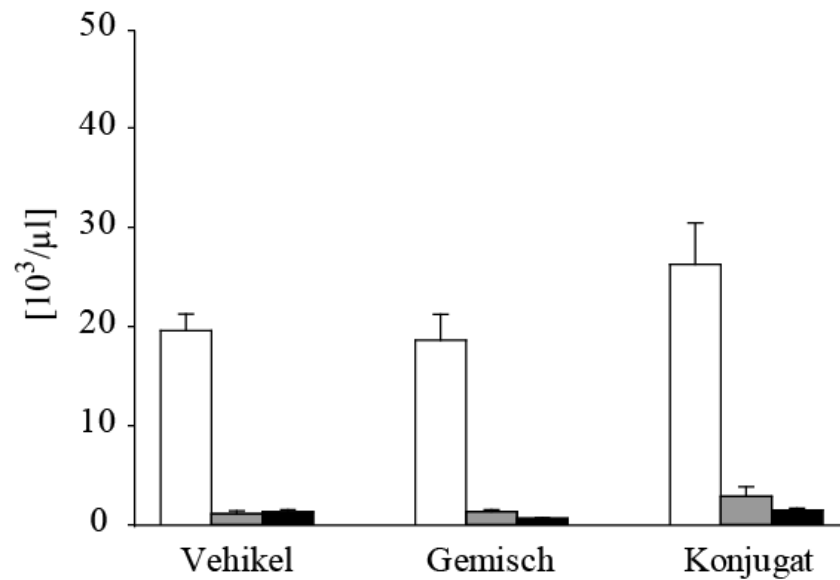


Abb. 4.24: Zytologie der bronchoalveoläre Lavage der konservierten Lunge. Die segmentkernigen Leukozyten zeigen keine Veränderung. Auch Makrophagen und Lymphozyten zeigten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Im Gegensatz zur Zytologie zeigt die Analyse der Zellvitalität eine signifikant höhere Vitalität der Leukozyten und Alveolarmakrophagen in der Konjugatgruppe verglichen mit der Vehikelgruppe (Abb. 4.25).

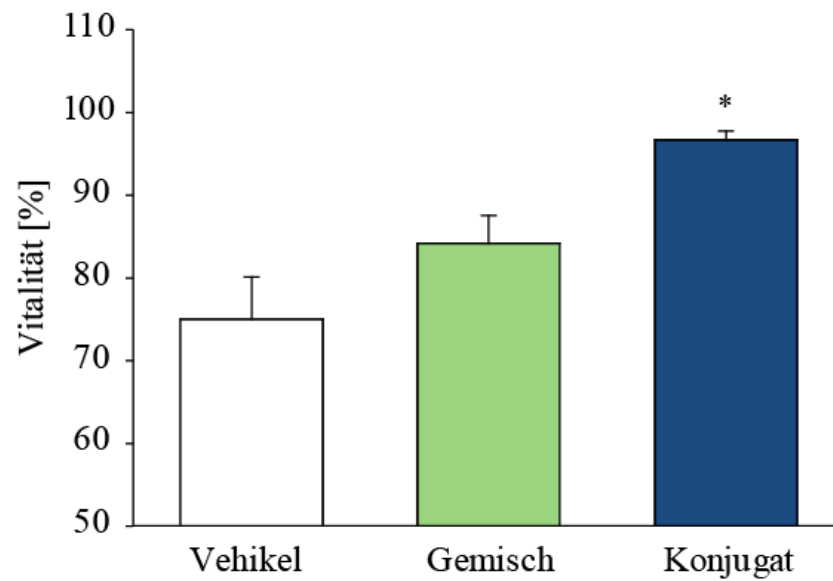


Abb. 4.25: Zellvitalität in der BAL nach Konservierung. Im Vergleich zur Vehikelgruppe bestand die höchste Vitalität in der Konjugatgruppe. * $P < 0,05$ vs. Vehikel.

4.3.2 Analyse des oxidativen Stress

Um zu untersuchen, ob bereits nach warmer Ischämie und anschließender hypothermer Konservierung eine Reduktion des oxidativen Stresses quantifizierbar ist, wurde auch in diesen Lungen die Lipidperoxidation untersucht. Trotz tendenzieller Reduktion der TBARS bestand jedoch kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 4.26).

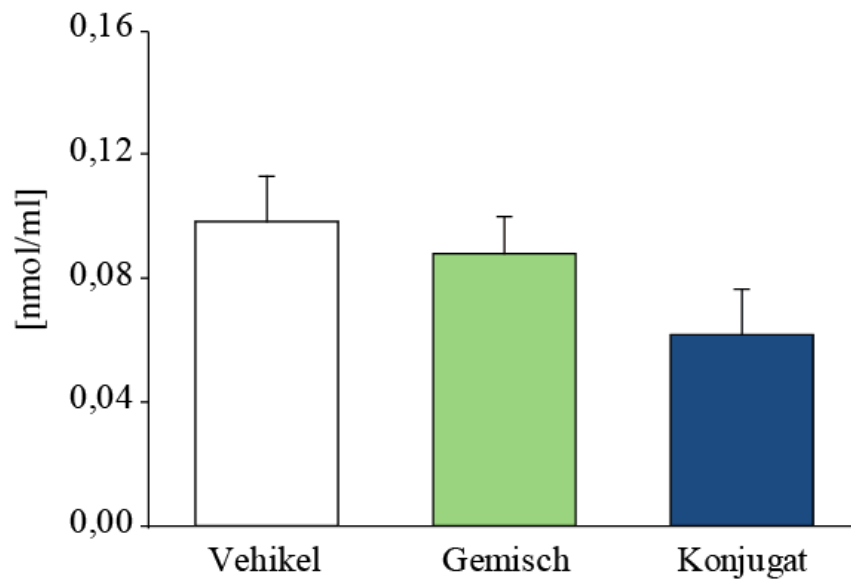


Abb. 4.26: Lipidperoxidation nach Konservierung. Bei der quantitativen Analyse der TBARS bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

4.3.3 Myeloperoxidase-Aktivität im Gewebe der kontralateralen Spenderlunge

Die MPO-Aktivität als Parameter der Leukozytenrekrutierung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Vehikel-, Gemisch- und Konjugatgruppe (Abb. 4.27). Die Werte waren signifikant niedriger als die nach Transplantation beobachteten MPO-Aktivitäten (siehe Abb. 4.15). Dies legt nahe, dass die Leukozytenrekrutierung nur unwesentlich im Rahmen der warmen Ischämie, sondern überwiegend während der postischämischen Reperfusion des Transplantats erfolgt.

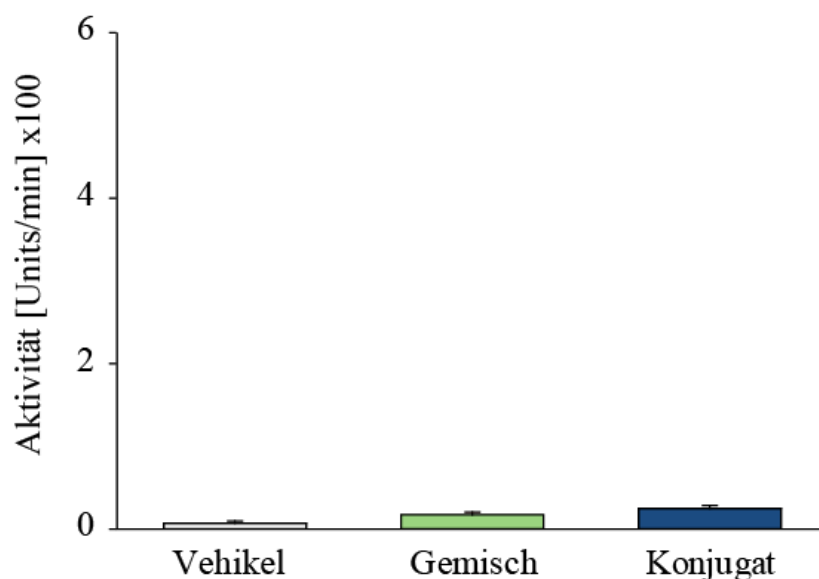


Abb. 4.27: Myeloperoxidase-Aktivität nach Konservierung. Die MPO-Aktivität war in allen Gruppen niedrig und ohne signifikante Unterschiede.

4.3.4 Histologie

Morphologisch zeigten die mit anti-PECAM-1/NA/Katalase vorbehandelten Lungen nach Konservierung eine verminderte interstitielle und intraalveoläre Leukozytenakkumulation und eine Reduktion des interstitiellen Ödems. Bei der Beurteilung der Lungen mittels dem Histologie Score wurden wie bereits beschrieben zusätzlich Endothelaktivierung, Fibrinbildung, Pneumozyten und Makrophagenakkumulation mit beurteilt. In der Gesamtdarstellung des Histologie Scores zeigten sich keine signifikanten Auswirkungen der verschiedenen Spendervorbehandlungen nach Ischämie und hypothermer Lagerung (Tab. 4.1).

KL						
	interstit. Ödem	alv. Ödem	Leukos intraalv.	Endothelschaden	Leuko.- adhäsion	Gesamt- Summe
Vehikel	1	0	0,6	1,8	1,2	4,5
Gemisch	1	0	0,33	1,17	1	4,33
Konjugat	1	0	0,33	1,83	0,83	4,33

Abb.4.1: Auswahl Parameter Histologie-Score, KL. Je mehr Score-Punkte, desto größer ist die Schädigung durch den verstärkten Ischämie-Reperfusionsschaden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

4.3.5 Wet/Dry Ratio

Die Wet/Dry Ratio ist als Maß für den Flüssigkeitsanteil am Gesamtgewicht der Lunge gleichbedeutend mit dem interstitiellen und intraalveolären Ödem. Hier konnte bereits nach warmer Ischämie und Konservierung eine signifikante Abnahme in der Konjugatgruppe im Vergleich zur nur mit NaCl/Glycerol behandelten Vehikelgruppe festgestellt werden (Abb. 4.28).

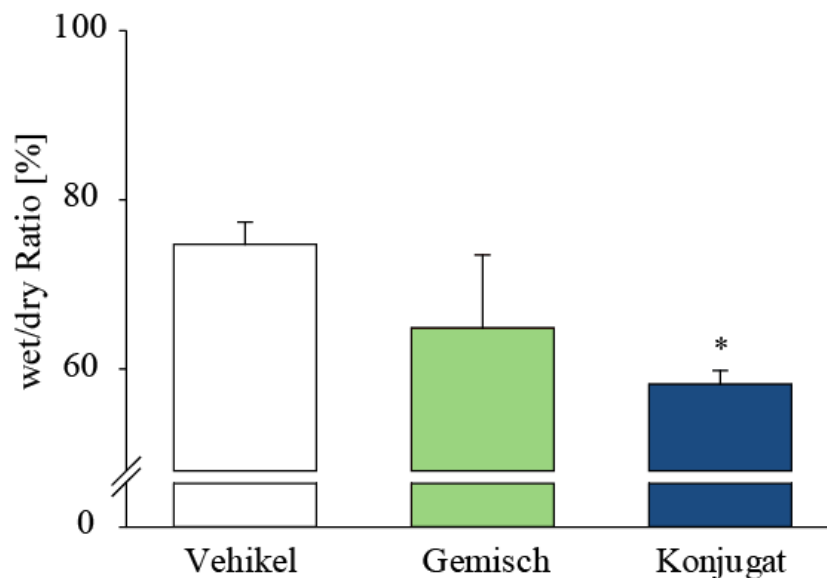


Abb. 4.28: Wet/Dry Ratio nach Konservierung. In der Konjugatgruppe fiel eine signifikante Abnahme des Flüssigkeitsanteils am Gesamtgewicht im Vergleich zur Vehikelgruppe auf. * $P < 0,05$ vs. Vehikel.

4.4 Auswirkungen der Transplantatvorbehandlung auf die kontralaterale Nativlunge des Empfängers (NL)

Nach der isolierten Darstellung der Ergebnisse des Transplantats und der Lunge nach Konservierung sollen im Folgenden die Auswirkungen der antioxidativen Spendervorbehandlung auf die Funktion der kontralateralen Nativlunge des Empfängers dargestellt werden. Obwohl die Nativlunge selbst nicht transplantiert wurde, wird ihre Funktion dennoch im Sinne eines generalisierten Reperfusionssyndroms (*Distant Organ Injury*) in Mitleidenschaft gezogen.

4.4.1 Gasaustausch

Von besonderer Bedeutung in der Reperfusionsphase ist der Gasaustausch. Der Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) Nativlunge zeigte nach Reperfusion in allen Gruppen konstante Werte. Diese waren jedoch in der Konjugatgruppe signifikant höher, als in den anderen Behandlungsgruppen und befinden sich auf dem Niveau der scheinoperierten Tiere (Abb. 4.29).

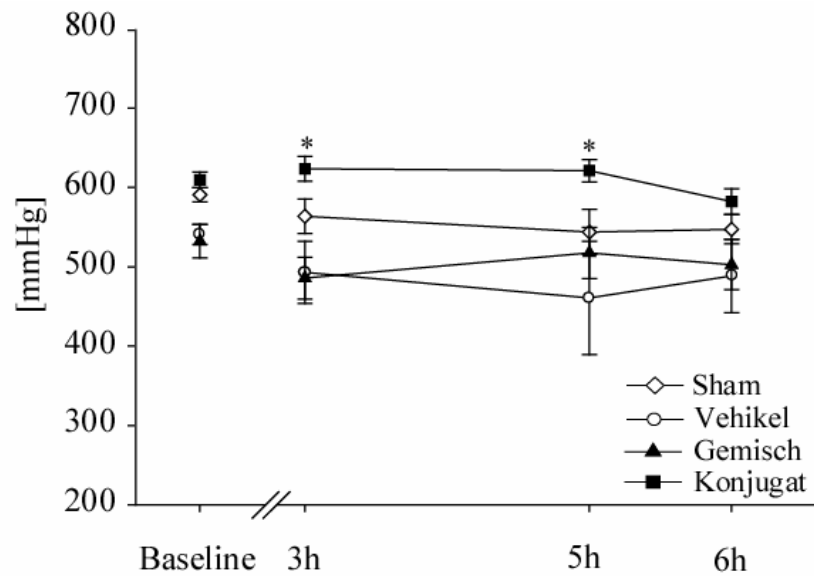


Abb. 4.29: Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) der Nativlunge. Die PaO_2 Werte verhielten sich über den gesamten Zeitraum stabil. Die Werte der Konjugatgruppe sind dabei signifikant höher, als die der Vehikel- und Gemischgruppe. * $P < 0,05$ vs. Vehikel und Gemisch.

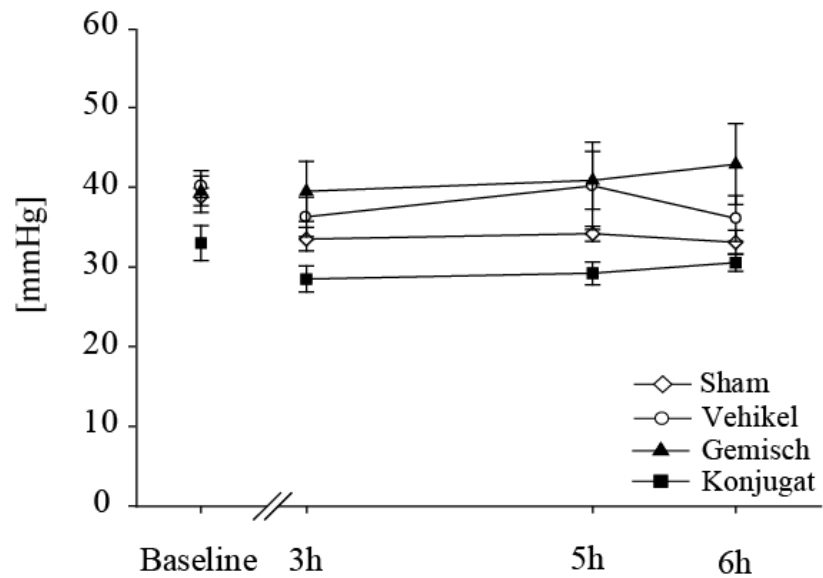


Abb. 4.30: CO₂-Partialdruck (PaCO₂) der Nativlunge. Der PaCO₂ blieb über den ganzen Beobachtungszeitraum konstant und zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Auch der CO₂-Partialdruck (PaCO₂) blieb während der Reperfusionsphase in allen Gruppen konstant. Es zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 4.30).

4.4.2 Compliance

Die *Dynamic Lung Compliance* als wichtiger Parameter der Lungenfunktion zeigte in der Nativlunge keine Änderungen. Es bestanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 4.31).

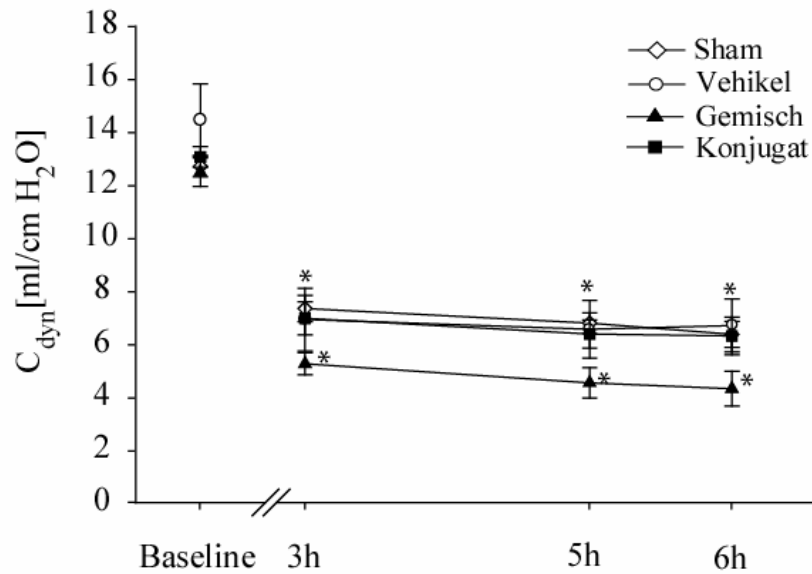


Abb. 4.31: Dynamic Lung Compliance der Nativlunge. Die Compliance zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen und war im Verlauf stabil. *P < 0,05 vs. Baseline.

Das intrapulmonale Shuntvolumen der Nativlunge zeigte sich tendenziell niedriger in der Konjugatgruppe verglichen mit den anderen Behandlungsgruppen, jedoch wurde im Vergleich mit den anderen Behandlungsgruppen das Signifikanzniveau nicht erreicht (Abb. 4.32).

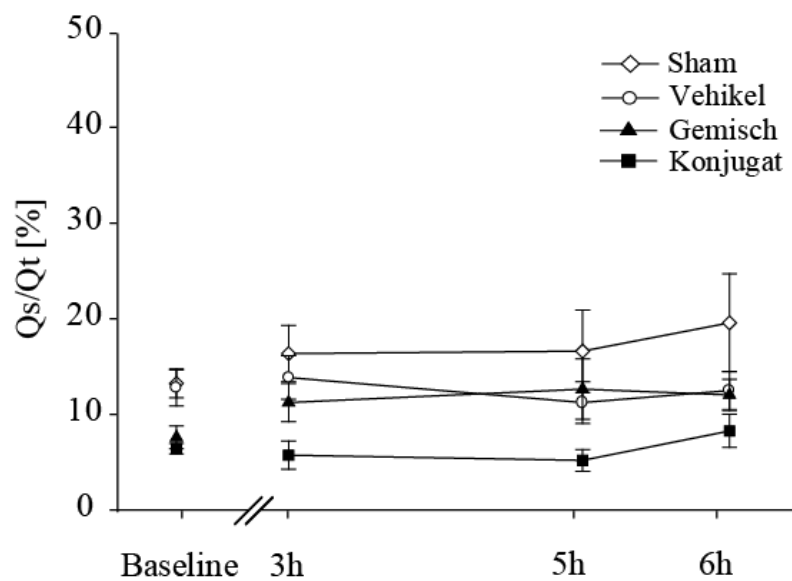


Abb. 4.32: Intrapulmonale Shuntfraktion der Nativlunge. Die Konjugatgruppe zeigte ein tendenziell niedrigeres Shuntvolumen im Vergleich zu mit Vehikel oder Gemisch behandelten Tieren. Es bestand jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

4.4.3 Analyse der bronchoalveolären Lavage

Bei der zytologischen Untersuchung der BAL der Nativlunge zeigte sich gegenüber der Vehikelgruppe eine leichte Abnahme der segmentkernigen Leukozyten nach der Behandlung des Transplantats mit dem Gemisch aus Einzelsubstanzen. In der Konjugatgruppe war die Zahl der Segmentkernigen signifikant niedriger als in der Vehikelgruppe (Abb. 4.33). Bezüglich der Makrophagen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

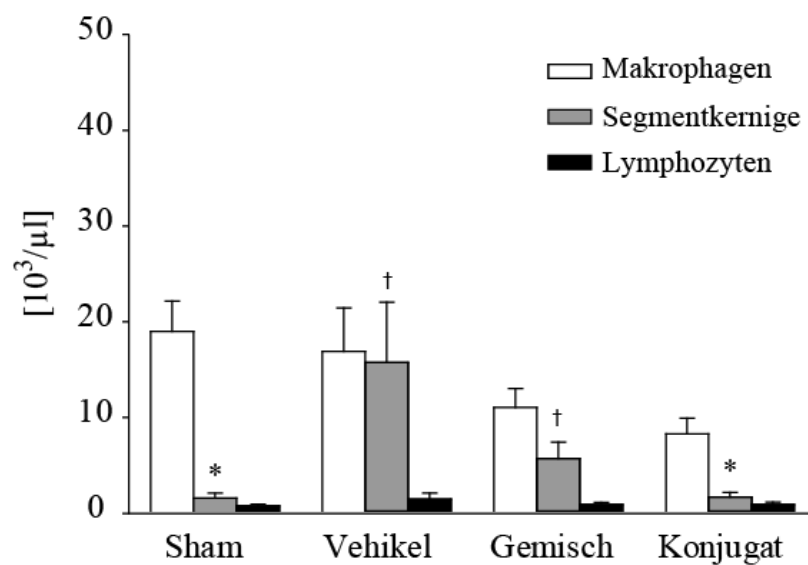


Abb. 4.33: Zytologie der Bronchoalveolären Lavage der Nativlunge. Die Anzahl der Segmentkernigen unterschied sich in der Konjugatgruppe signifikant von der Vehikelgruppe. Die Makrophagen zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen. * $P < 0,05$ vs. Vehikel, † $P < 0,05$ vs. Sham.

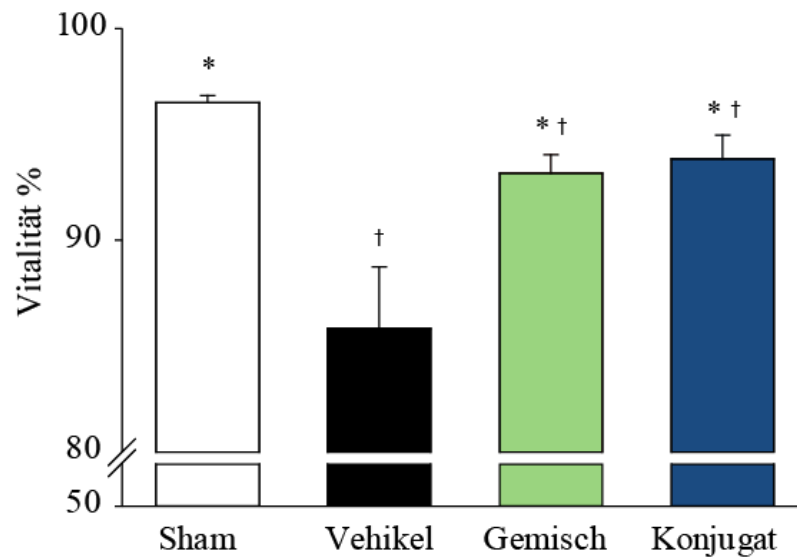


Abb. 4.34: Zellvitalität in der BAL der Nativlunge. Die Vitalität von Gemisch- und Konjugatgruppe unterschied sich signifikant von der Vehikelgruppe. Die Konjugatbehandlung zeigte keine weitere Verbesserung der Werte gegenüber der Gemischgruppe. * $P < 0,05$ vs. Vehikel, $^{\dagger}P < 0,05$ vs. Sham.

Bei der zusätzlichen Analyse der Zellvitalität in der BALF fiel ein signifikante Anstieg der Zellvitalität sowohl in der Gemisch-, als auch in der Konjugatgruppe gegenüber der Vehikelgruppe auf. Die Konjugatbehandlung zeigte jedoch keine weitere Verbesserung der Vitalität verglichen mit der Gemischgruppe (Abb. 4.34).

4.4.4 Histologie

Morphologisch zeigte sich in den Nativlungen der Konjugatgruppe eine signifikant reduzierte Abnahme der Leukozytenakkumulation bei ebenfalls signifikant verbesserter Zellvitalität. Die einzelnen Kriterien des Histologie Scores (Endothelaktivierung, Fibrinbildung, Ödem, Pneumozyten- und Makrophagenmorphologie) zeigten analog zum Gesamtscore keinen Einfluss der verschiedenen Spendervorbehandlungen auf die Morphologie der Nativlunge. (Tab. 4.2).

NL						
	interstit. Ödem	alv. Ödem	Leukos intraalv.	Endothelschaden	Leuko.- adhäsion	Summe
Sham	1	0	0,67	1,5	1,17	5,17
Vehikel	1	0	0	2	1	5
Gemisch	1,17	0	0,83	1,67	1,17	6,17
Konjugat	1	0	0,67	2	1,17	6

Tab. 4.2: Auswahl Parameter Histologie Score, NL. Je mehr Punkte im Histologie Score, desto größer die Schädigung durch den verstärkten Ischämie-Reperfusionsschaden. In der Histologie konnte kein signifikanter Einfluss der Transplantatvorbehandlung auf die Nativlunge festgestellt werden.

4.4.5 Analyse des oxidativen Stress

Um den Oxidativen Stress in der Nativlunge zu quantifizieren, wurde wiederum eine Analyse der TBARS durchgeführt (Abb. 4.35). Nach Transplantation zeigten die Transplantationsgruppen deutlich höhere Werte, als die Lungen der scheinoperierter Tiere. Trotz einer tendenziellen Abnahme der TBARS in der Konjugatgruppe konnten bezüglich des oxidativen Stress keine statistisch signifikanten Effekte gezeigt werden.

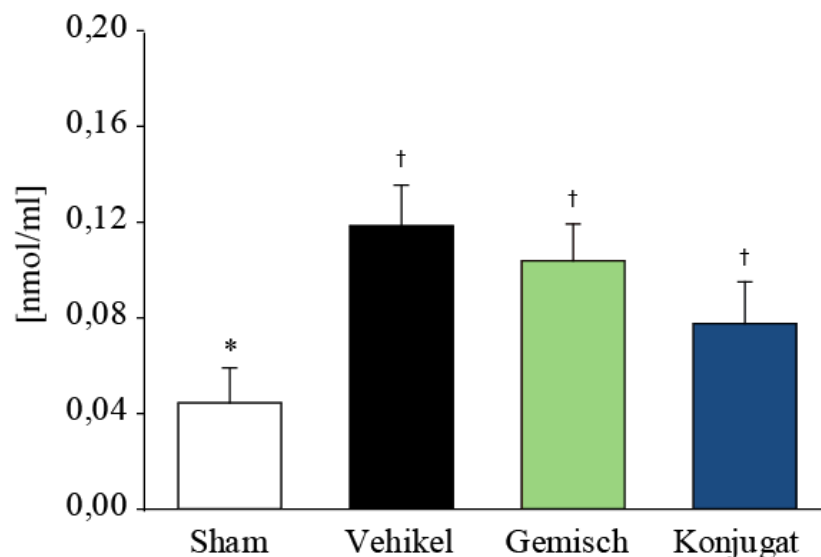


Abb. 4.35: Lipidperoxidation in der Nativlunge. Es bestand kein signifikanter Unterschied der TBARS zwischen den Gruppen, die Konjugatgruppe zeigte aber eine tendenzielle Abnahme der Werte. * $P < 0,05$ vs. Vehikel, † $P < 0,05$ vs. Sham.

5. Diskussion

5.1 Non Heart Beating Donors (NHBD) zur Erweiterung des Spenderpools in der Lungentransplantation

Die erhebliche Diskrepanz zwischen Neuanmeldungen zur Transplantation und der Zahl zur Verfügung stehender Spenderorgane zeigt die dramatische Situation in der Lungentransplantationschirurgie in den letzten Jahren (Trulock et al., 2003). Hauptursache für den Mangel an Spenderlungen sind die im Vergleich zu anderen Organen relativ kurze tolerierte Ischämiezeit (6 Stunden) (Davis, Jr. and Pasque, 1998) und die strengen Spenderkriterien. Letztlich sind so nur ca. 25% der Lungen von Multiorganspendern für die Transplantation geeignet.

Eine Möglichkeit zur Erweiterung des Spenderpools ist die Modifikation der Spenderkriterien (Bhorade et al., 1993) und damit Transplantation von Spenderlungen, die entweder eine verlängerte Ischämiezeit aufweisen, oder die übrigen strikten Anforderungen an das Spenderorgan nicht oder nur teilweise erfüllen (s. Abb. 1.1). In diesem Zusammenhang würde der Einsatz von Lungen sogenannter Non Heart Beating Donors (NHBD) eine wesentliche Erweiterung des Spenderpools bedeuten. Diese Organe stammen, im Gegensatz zu den bisher in der Klinik verwendeten Lungen hirntoter Spender, von Spendern mit stattgehabtem Herz-Kreislaufstillstand, sog. „herztoten“ Organspendern. Durch den Kreislaufstillstand sind diese Organe vor Transplantation zusätzlich zur hypothermen Konservierung einer prolongierten warmen Ischämie im Körper des Spenders ausgesetzt. Durch die insbesondere im Rahmen der warmen Ischämie entstandene Schädigung sind die Lungen der NHBD erheblich in ihrer Funktion eingeschränkt (Hiraga, 1992; Kootstra, 1997; Loehe et al., 1987; Steen et al., 1994b; Steen et al., 2001). Aus diesem Grund stellt die experimentelle Transplantation von NHBD-Lungen ein interessantes Modell zur Untersuchung möglicher Therapiestrategien zur Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob die deutlich eingeschränkte Funktion der NHBD-Lungen nach Transplantation durch eine innovative, selektive antioxidative Therapie verbessert werden kann und derart vorbehandelte Lungen dann möglicherweise zur Erweiterung des Spenderpools beitragen könnten. Die Selektivität der antioxidativen Therapie wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchung durch das sog. „vaskuläre Immunotargeting“ erreicht. Dabei wird das Therapeutikum an einen Antikörper gekoppelt, der ein für das Zielorgan möglichst spezifisches Antigen detektiert und bindet. Auf diesem Wege sollen hohe Wirkkonzentrationen im Zielorgan erreicht werden. Der selektive Transport von therapeutischen Substanzen wie beispielsweise Enzymen durch Koppelung an Antikörper („Immunotargeting“) wurde bereits in vorangegangenen

Untersuchungen erfolgreich u.a. in der gezielten Behandlung bestimmter Tumore (Carrion et al., 2004) und zur Reduktion der Neoangiogenese in der onkologischen Forschung eingesetzt (Nobs et al., 2006; Moffatt et al., 2006). Prinzipiell bieten sich durch die Möglichkeit der Konjugation von Wirkstoffen an Antikörper und damit des spezifischen (intra-)zellulären Transports in variable Zielzellen weitreichende vielversprechende Therapiemöglichkeiten in den verschiedensten Bereichen der Medizin.

In der vorliegenden Arbeit wurde das antioxidativ wirksame Enzym Katalase mittels Neutravidin (NA) an einen monoklonalen anti-PECAM-1 Antikörper gekoppelt; es entstehen anti-PECAM-1/NA/Katalase Nanopartikel. Katalase erwies sich bereits in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen als potentes Antioxidans (Atochina et al., 1996; Christofidou-Solomidou et al., 2003; Greenwald, 1994; Atochina et al., 1998). Durch die Integration von Katalase in anti-PECAM-1/NA/Katalase Nanopartikel (anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat) wirkt das Antioxidans nicht ubiquitär sondern akkumuliert über Bindung an das auf Endothelzellen exprimierte PECAM-1 Antigen spezifisch an der Oberfläche von Endothelzellen, dem primären Angriffspunkt des Ischämie-Reperfusionsschadens im Rahmen der Organtransplantation. In multivalenter, nicht aber in monovalenter Form werden anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate nach Bindung an der Endothelzelloberfläche in die Endothelzelle internalisiert. Das molare Verhältnis der Einzelkomponenten und damit die Größe der Nanopartikel ist entscheidend für den Internalisierungsprozess der anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugate (Muro et al., 2003a; Wiewrodt et al., 2002; Muzykantov, 2005; Muro et al., 2003b; Muro et al., 2003a). Nur Partikel mit einer Größe von 200-300nm werden suffizient in die Endothelzellen internalisiert. Da die Konjugate damit nicht alleine an der Endothelzelloberfläche gebunden vorliegen sondern zusätzlich in die Endothelzelle aufgenommen werden, antagonisieren PECAM-1/NA/Katalase Nanopartikel auf diesem Wege nicht nur die extrazelluläre sondern insbesondere auch die intrazelluläre Radikalbildung (Christofidou-Solomidou and Muzykantov, 2006). Bedingt durch die starke Oberflächenexpression von PECAM-1 auf Endothelzellen per se und einem Anteil des pulmonalen Endothels von ca. 30% an der gesamten Endothelzelloberfläche des Körpers wird eine relative Organspezifität des Konjugats für die Lunge erreicht (Davies and Hagen, 1998).

Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften der anti-PECAM-1/NA/Katalase Nanopartikel, nämlich 1.) Endothelspezifität, 2.) Organselektivität und 3.) Internalisierung, scheinen PECAM-1/NA/Katalase Nanopartikel einen vielversprechenden Ansatz zur Prävention und Therapie des Ischämie-Reperfusionsschadens darzustellen. Tatsächlich konnten in erste Untersuchungen im Rattenmodell eine dramatische Reduktion der Schädigung des pulmonalen Endothels durch reaktive Sauerstoffspezies während Ischämie und Reperfusion dokumentiert werden. Im Rattenmodell ging dies mit einer signifikant

verbesserten Transplantatfunktion nach Lungentransplantation erzielt werden (Kozower et al., 2003; Muro et al., 2001; Muzykantov, 2001a; Muzykantov et al., 1996; Muzykantov, 2001b; Muzykantov, 1994). Die Effekte der anti-PECAM-1/NA/Katalase Nanopartikel in einem kliniknahen NHBD-Lungentransplantationsmodell im Großtier waren jedoch bislang nicht untersucht und sollten daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert werden.

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass durch die Vorbehandlung von Lungenspendern mit anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugaten eine Protektion der Transplantatlunge sowohl während warmer Ischämie und prolongierter Konservierung, als auch in der Reperfusionsphase erreicht wird. Morphologisch konnte 6 Stunden nach Reperfusion eine verminderte Endothelzellschädigung mit konsekutiv nachweislich geringerer Ödembildung im Transplantat nachgewiesen werden. Ursache hierfür war eine deutlich messbare Reduktion des oxidativen Stresses durch die intrazelluläre antioxidative Wirkung von Katalase. Auch durch die intravasale Applikation von unkonjugierter Katalase konnte die Lipidperoxidation reduziert werden, so dass zusätzlich zur intrazellulären Wirkung auch die extrazelluläre Radikalreduktion durch Katalase zur Verminderung des oxidativen Stress beiträgt.

Die morphologischen Befunde korrespondierten dabei eindrücklich mit den Parametern der Lungenfunktion. Diese konnte durch die Transplantatvorbehandlung signifikant verbessert werden. Beispielsweise erreichte die arterielle Oxygenierung 6 Stunden nach Reperfusion mit Werten bis zu 600 mmHg bei Beatmung mit einem FiO₂ von 100% sogar das Niveau der scheinoperierten Tiere.

Neben dem Transplantat spielt auch die kontralaterale Lunge des Empfängers eine wichtige Rolle für den weiteren Verlauf von Hämodynamik und Gasaustausch des Empfängers. Im Sinne eines sog. *Distant Organ Injury* kann nach Lungentransplantationen die kontralaterale Nativlunge des Empfängers mitgeschädigt werden. Es findet hierbei eine generalisierte inflammatorische Reaktion mit Leukozytenaktivierung, Freisetzung von Zytokinen, Endothelzellschaden und konsekutivem Ödem statt. Obwohl die Nativlunge selbst nicht transplantiert wurde, können daher erhebliche Funktionsstörungen und morphologische Veränderungen auftreten, die im Sinne eines Circulus vitiosus wiederum die transplantierte Lunge und den gesamten Kreislauf negativ beeinflussen können (Seekamp and Ward, 1993).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher auch untersucht werden, ob eine verbesserte Transplantatfunktion nach Vorbehandlung mit dem anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat einen positiven Einfluss auf die kontralaterale Nativlunge des Empfängers hat. Durch die optimierte Transplantatfunktion konnten die generalisierte Entzündungsreaktion im Empfängertier reduziert werden, was sich konsekutiv in einer fast uneingeschränkten Lungenfunktion und Morphologie der Nativlunge zeigte. Der Kollateralschaden der nativen

Empfängerlunge im Rahmen des nach warmer Ischämie besonders ausgeprägten Ischämie- Reperfusionsschadens konnte also durch die Vorbehandlung des Transplantats deutlich vermindert werden; eine nachhaltige Schädigung der Nativlunge als Folge der Transplantation eines vorgeschädigten Organs weitgehend vermieden werden.

5.2 Diskussion des Modells

Das Modell der linksseitigen orthotopen Einzellungentransplantation am Schwein ist in der experimentellen Chirurgie bereits etabliert und mehrfach zur Analyse der frühen Transplantfunktion in der Reperfusionsphase eingesetzt worden (Loehe et al., 1987; Loehe et al., 2002; Kemming et al., 1998; Müller C, 1997; Steen et al., 2001). Der Grossterversuch mit Schweinen gewährleistet eine kliniknahe Situation. Die Operationstechnik entspricht im Wesentlichen der klinischen Einzellungentransplantation, allerdings kann aufgrund anatomischer Besonderheiten der rechten Schweinelunge (zusätzlicher Lobus trachealis) nur die linke Lunge transplantiert werden, die der menschlichen in Form und Aufbau sehr ähnlich ist. Da neben der Anatomie auch die an der Manifestation des Ischämie-Reperfusionsschadens beteiligten Pathomechanismen im wesentlichen identisch sind, ist die experimentelle Lungentransplantation am Schwein ein relevantes Modell für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen (Shiraishi et al., 2001). Beispielsweise ist die Aktivität der Xanthin-Oxidase des Schweins als Quelle von Sauerstoffradikalen während Ischämie und Reperfusion vergleichbar mit der des Menschen. Im Gegensatz dazu weisen Ratten eine wesentlich höhere Xanthin-Oxidase Aktivität auf, was die Vergleichbarkeit von experimentellen Untersuchungen im Rattenversuch mit pathophysiologischen Bedingungen des Menschen einschränkt (Southard et al., 1987). Auch andere die Lunge betreffende artspezifische Unterschiede wie beispielsweise eine veränderte endotheliale NO-Freisetzung bei Hunden verglichen mit der des Menschen sind beim Schwein nicht beschrieben (Cremona et al., 1994).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die antioxidative Therapie durch Applikation von anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugaten bereits beim Spendertier. Als Grundlage für diese frühe Applikation von anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugaten dienten Voruntersuchungen von Kozower et al im Kleintiermodell. Im Rattenmodell wurden mit dem Ziel einer verbesserten Transplantatfunktion verschiedene Zeitpunkte der Konjugatapplikation untersucht, um einen möglichst effektiven Transport der Konjugate an das pulmonale Endothel zu erreichen (Kozower et al., 2003). Im Vergleich zur Applikation des Konjugats in das Empfängertier unmittelbar nach der Implantation und vor Reperfusion

des Organs erwies sich eine Vorbehandlung der Lungen vor Explantation und Konservierung, d. h. noch im Spender, als am wirkungsvollsten bezüglich morphologischer und funktioneller Verbesserungen. Auf diese Weise kann eine wirksame Protektion des pulmonalen Endothels bereits während der besonders kritischen Phase der warmer Ischämie und Konservierung gewährleistet werden. Aufgrund dieser Vorversuche wurde das Konjugat auch im vorliegenden Versuch kurz vor Induktion des Herztods und Explantation des Organs in den Truncus pulmonalis des Spendertieres appliziert. Vor Infusion des Konjugats wurden sowohl die Vena cava inferior als auch die Aorta abgeklemmt, um das Zirkulationsvolumen auf ca. 50% zu verkleinern und so eine ausreichende Akkumulation des Konjugats in der Lunge zu gewährleisten. Nach 5-minütiger Zirkulation wurde der Herzod induziert und es folgte die 90-minütige warme Ischämie und hypotherme Konservierung (18h, 4°C).

Um eine mit der Transplantation von NHBD-Organen mit stattgehabtem Kreislaufstillstand vergleichbare Situation zu schaffen, wurden die Transplantationen im Spender einer 90-minütigen warmen Ischämie unterzogen. Zahlreiche Voruntersuchungen beschäftigten sich mit der Analyse der Effekte von warmer Ischämie unterschiedlicher Dauer auf den pulmonalen Reperfusionsschaden. In einem experimentellen Modell mit geplantem Überleben der Empfängertiere konnte eine Woche nach Transplantation von NHBD-Lungen an Schweinen mit vorangegangener 30-minütiger warmer Ischämie eine ausreichende Transplantatfunktion ohne Unterschied zu Transplantationen ohne vorhergegangene warme Ischämiezeit festgestellt werden (Buchanan et al., 1996). Egan et al. untersuchten die Auswirkungen einer 60-minütigen warmen Ischämie (Egan et al., 1995). Er berichtete über eine erhaltene pulmonale Transplantatfunktion von NHBD-Lungen nach einer warmen Ischämiezeit von einer Stunde vor hypothermer Flush-Konservierung. Rega et al. konnten zeigen, dass die Ischämiezeit durch zusätzliches oberflächliches Kühlen ohne wesentlichen Verlust der Transplantatfunktion auf bis zu 7 Stunden ausgedehnt werden kann (Rega et al., 2004). Ohne oberflächliches Kühlen scheinen damit warme Ischämiezeiten von bis zu 60min nicht mit einer wesentlichen Einschränkung der Transplantatfunktion einherzugehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte von anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugaten auf die Transplantation von vorgeschädigten Spenderlungen zu analysieren. Im Gegensatz zu den oben aufgeführten experimentellen Protokollen anderer Arbeitsgruppen wurde daher im vorliegenden Versuch eine warme Ischämiezeit von 90 Minuten gewählt, die den Ischämie-Reperfusionsschaden erheblich verstärkt und zu gravierenden Funktionseinschränkungen führt (Loehe et al., 1987). Im Anschluss folgte zudem eine mit 18h wesentlich prolongierte hypotherme Lagerung der Lungen. Da die bisher akzeptierte Ischämiezeit für Lungen maximal 6 Stunden beträgt, würde dieses Protokoll in der klinischen Situation einen deutlichen Zeitgewinn bedeuten. Dies könnte zum einen für

ausführliche Untersuchungen am Transplantat (z.B. HLA-Typisierung) genutzt werden. Zum Anderen könnte dadurch der Einzugsbereich für Organexplantationen vergrößert und folglich der Spenderpool zusätzlich erweitert werden. Als Beobachtungszeit wurde im vorliegenden Versuch ein Zeitraum von 6 Stunden nach Reperfusion gewählt, der eine Beurteilung der frühen Veränderungen nach experimenteller Lungentransplantation erlaubt.. Steen et al. konnten zeigen, dass die Transplantatfunktion nach etwa 2 – 4 Stunden ein Plateau erreichte, das sich auch während der Beobachtungsphase bis 24 Stunden nicht mehr wesentlich veränderte (Steen et al., 1994a).

Prinzipiell kommen NHBD-Spenderlungen durchaus für den Einsatz in der Lungentransplantation in Frage. In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurden in Übereinstimmung mit den eigenen Versuchen morphologische Veränderungen und Transplantatdysfunktion im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens bereits innerhalb weniger Stunden nach Reperfusion beobachtet (Steen et al., 1990; Kishima et al., 1994; Egan et al., 1995; Bryan et al., 1999). Bei Transplantation von NHBD-Lungen im Großtiermodell konnte von Loehe et al. aufgrund der prolongierten Ischämie und Konservierung eine signifikante Reduktion der Transplantatfunktion gezeigt werden. Trotz dieser Auswirkungen wurden in der Klinik bereits NHBD-Lungen nach 70-minütigem Kreislaufstillstand erfolgreich transplantiert. Erste follow-up Untersuchungen nach 5 Monaten zeigten eine regelrechte Transplantatfunktion (Steen et al., 2001). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lungentransplantate von Non Heart Beating Donors zwar prinzipiell transplantierbar sind, eine deutliche Verbesserung der Transplantatfunktion nach Transplantation von Organen von NHBD muss jedoch erzielt werden, um diese Organe für die breite klinische Lungentransplantation attraktiv zu machen.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Einfluss der Konjugatapplikation auf den Gasaustausch und die Hämodynamik des Spenders

Die Analyse von Hämodynamik und Gasaustausch des Spendertieres diente der Untersuchung möglicher Auswirkungen des Abklemmens von V. cava inf. und Aorta und der anschließenden Konjugatapplikation selbst.

Der Gasaustausch war sowohl während der Präparation, als auch nach dem Abklemmen der Gefäße stabil und ohne Gruppenunterschied. Dies zeigt zum einen, dass die im Rahmen der Konjugatapplikation erfolgte Verkleinerung des Zirkulationsvolumens nicht zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion führte. Zum anderen belegen die in

Abb. 4.1 und 4.2 dargestellten PaO_2 - und PaCO_2 -Werte der Spender eine gleichmäßige und standardisierte Beatmungstechnik bei allen Tieren.

Im Vergleich zu den anderen Parametern der Hämodynamik (MAP, mPAP) führte das Abklemmen von V. cava inf. und Aorta erwartungsgemäß zu einer Abnahme des HZV. Die Abnahme des HZV und der ebenfalls beobachtete Anstieg der Herzfrequenz können als physiologische Reaktionen auf die Reduktion der Vorlast bei gleichzeitig gesteigerter Nachlast des Herzens (*Frank - Starling Mechanismus*) verstanden werden. Vergleichbare Veränderungen wurden auch in früheren Untersuchungen beschrieben (Loehe et al., 2002).

5.3.1 Effekte des anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugats auf das Transplantat

Effekte auf die Endothelzellintegrität

Das pulmonale Endothel stand bei der Analyse der Effekte durch die Konjugatbehandlung der Lungen im Zentrum unseres Interesses. Die Endothelzelle ist der primäre Angriffspunkt der im Rahmen von Ischämie und Reperfusion gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (Muzykantov et al., 1996; Christofidou-Solomidou and Muzykantov, 2006); daher stellt die Protektion der Endothelzellen sowohl während Ischämie und Konservierung, als auch während der Reperfusion die Basis für eine gute Lungenfunktion nach Transplantation dar.

Die Verminderung der Endothelschädigung im Transplantat war assoziiert mit einer nachweislich geringeren Gefäßpermeabilität in der pulmonalen Mikrozirkulation. Dies resultierte in einer signifikanten Reduktion des intraalveolären Ödems. Nach 6 Stunden Reperfusion konnte allerdings noch kein signifikant niedrigerer Flüssigkeitsanteil am Gesamtgewicht der Transplantatlungen (wet/dry Ratio) gezeigt werden.

Effekte auf die Leukozytenrekrutierung

In der Lunge existiert neben im Blut zirkulierenden Leukozyten ein Pool ortsständiger Leukozyten, die sich hauptsächlich im alveolokapillären Kompartiment aufhalten und am Endothel entlang rollen und adhärent werden können. Diese Leukozyten migrieren bevorzugt über Zell-Zell Verbindungen in das Interstitium (Kuebler and Goetz, 2002; Luscinskas et al., 2002).

Nach Therapie mit dem anti-PECAM/Katalase Konjugat zeigte sich mittels histologischer Analyse sowie über Bestimmung der MPO-Aktivität eine Zunahme der Anzahl

rekrutierter Leukozyten in der Lunge. Die zytologische Analyse der BAL Flüssigkeit ergab dabei eine präferentielle Rekrutierung von Neutrophilen. Die bei mit anti-PECAM/Katalase Konjugaten behandelten Tiere im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren verbesserte Mikrozirkulation (belegt durch ein reduziertes Shuntvolumen bei verbessertem Gasaustausch), könnte die Ursache für diese scheinbare Diskrepanz (verbesserte Endothelzellfunktion vs. gesteigerte Leukozytenrekrutierung) darstellen. Durch die verbesserte mikrovaskuläre Perfusion erhält eine größere Zahl zirkulierender Leukozyten, insbesondere neutrophiler Leukozyten, „Zutritt“ zur pulmonalen Mikrostrombahn und kann in das Interstitium der Lunge bzw. in die Alveolen migrieren. Dies erklärt den quantitativen Anstieg Zahl intraalveolärer Neutrophiler in der histologischen Analyse.

Die Leukozytenrekrutierung scheint nicht nur den Ischämie-Reperfusionsschaden voranzutreiben, sie könnte zusätzlich protektiv wirksam sein. So konnte in einer Arbeit von Pietarinen-Runtti et al. gezeigt werden, dass insbesondere neutrophile Leukozyten im Vergleich zu Monozyten und Makrophagen über ein äußerst hohes antioxidatives Potential verfügen, da sie eine besonders hohe Aktivität von Mangan- und Kupfer-Zink-Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase aufweisen (Pietarinen-Runtti et al., 2000).

Die hier gezeigte gesteigerte Leukozytenrekrutierung nach Behandlung mit dem anti-PECAM/Katalase Konjugat steht in Widerspruch zu den in Kleinterversuchen anderer Gruppen (Kozower et al., 2003) nachgewiesenen Reduktion der Myeloperoxidase- Aktivität, eines leukozyten-spezifischen Enzyms, in der postischämischen Lunge von mit dem anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat behandelten Ratten. Im Gegensatz zu den hier dargestellten Untersuchungen wurde das Lungentransplantat in der von Kozower et al. beschriebenen Studie weder einer warmen Ischämie, noch einer hypothermen Langzeitkonservierung ausgesetzt, so dass ein direkter Vergleich nur bedingt möglich ist.

Effekte auf den oxidativen Stress

Die in der vorliegenden Arbeit in vitro gezeigte protektive Wirkung des anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugats auf mit H_2O_2 inkubierten HUVECs konnte durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden (Kozower et al., 2003; Wiewrodt et al., 2002). Katalase ist in der Lage, in der Endothelzelle anfallendes H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff zu reduzieren. Korrespondierend dazu waren die mit Konjugat behandelten Endothelzellen 5 Stunden nach Inkubation mit H_2O_2 vital und morphologisch unauffällig.

Die Kinetik der Radikalbildung nach Organischämie in vivo konnten in mehreren Modellen definiert werden (Land W, 1996; Novick et al., 1997). Die

Sauerstoffradikalproduktion im Lungentransplantat erreicht ihr kinetisches Maximum innerhalb der ersten Minuten nach Reperfusion (Land W, 1996; Novick et al., 1997). Im vorliegenden Versuch zeigten die Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) als Marker für die Lipidperoxidation durch Sauerstoffradikale im Lungentransplantat sowohl für die Gemisch- als auch für die Konjugatgruppe niedrigere Werte, als in den nicht mit Katalase vorbehandelten Gruppen. Die Tatsache, dass reaktive Sauerstoffspezies nicht nur im Zytosol der Endothelzellen, sondern auch an deren Oberfläche und im zirkulierenden Blut vorkommen, könnten die nicht signifikant unterschiedlichen protektiven Effekte des überwiegend intrazellulär wirkenden Konjugats gegenüber den v.a. extrazellulär agierenden unkonjugierten Einzelsubstanzen erklären.

Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß Leukozyten nach Transplantation durch oxidativen Stress und Inflammation aktiviert wurden und inwieweit diese Aktivierung durch die Behandlung mit anti-PECAM/Katalase Nanopartikeln moduliert wird, erfolgte die Analyse des sog. oxidativen Bursts in Zellen der bronchoalveolären Lavage nach 6 Stunden Reperfusion. Leukozyten der Konjugatgruppe zeigten eine gegenüber den übrigen Gruppen eine tendenziell höhere Aktivierbarkeit der leukozytären Radikalproduktion. Da die PMA-induzierte Radikalproduktion bei Leukozyten der Konjugatgruppe zudem mit Leukozyten sham-operierter Tiere vergleichbar war, lässt dies auf eine reduzierte basale Aktivierung der Zellen während Ischämie und Reperfusion schließen.

Hämodynamik und Lungenfunktion

Analog zu Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Müller C, 1997; Steen et al., 1990) zeigte der pulmonalvaskuläre Widerstand (PVR) der Transplantatlungen nach Reperfusion in allen Behandlungsgruppen höhere Werte, als in der scheinoperierten Gruppe. Dies steht im scheinbaren Widerspruch zur verbesserten Gasaustauschfunktion nach Behandlung mit Konjugat (s.o.). Möglicherweise führte jedoch das in der Konjugatgruppe signifikant niedrigere intrapulmonale Shuntvolumen im Vergleich zur Vehikel- und Gemischgruppe zu einer ausbleibenden Reduktion des PVR der Transplantatlungen, da in den kleinen Gefäßen der pulmonalen Mikrozirkulation ein höherer Widerstand herrscht, als in den größeren Shuntgefäßen. Entsprechend beschrieben Neumann et al. (Neumann and Hedenstierna, 2001) in tierexperimentellen Untersuchungen nach Induktion eines akuten Lungenversagens bei Schweinen insbesondere einen deutlich erhöhten intrapulmonalen Shunt als Ursache für eine massive Gasaustauschstörung infolge der Veränderungen in der Mikrozirkulation.

Die morphologischen und biochemischen Effekte (s.o.) durch das anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugats resultierten in einer deutlich messbaren Verbesserung des Gasaustausches im isoliert ventilierten und perfundierten Transplantat. Kozower et al. (Kozower et al., 2003) konnte bereits im Kleinterversuch ohne Lungenkonservierung unter Verwendung des identischen Konjugats einen besseren Gasaustausch nach Spendervorbehandlung nachweisen. Trotz der zusätzlichen warmen Ischämie und 18-stündigen hypothermen Lagerung im vorliegenden NHBD-Modell konnten diese vielversprechenden Ergebnisse auch in der vorliegenden Arbeit im Grosstiermodell bestätigt werden. Die CO₂-Retention konnte in der Konjugatgruppe signifikant verringert werden. Korrespondierend zu den verbesserten Perfusionsverhältnissen in den Transplantaten dieser Tiere konnte auch eine bessere Ventilation erreicht werden. Dies äußerte sich in einem signifikant höheren PaO₂ in der Konjugatgruppe, der sogar das Niveau der scheinoperierten Tiere erreichte. Bezüglich des Gasaustausches und der intrapulmonalen Shuntfraktion im Transplantat konnte damit durch das Konjugat eine deutliche Verbesserung zentraler Transplantatfunktionen erzielt werden. Es zeigte sich darüber hinaus ein eindeutiger Vorteil des anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugats gegenüber dem Gemisch aus Einzelsubstanzen.

5.3.3 Isolierte Effekte des anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugats auf Ischämie und Konservierung der Lunge

Die Applikation des antioxidativen Konjugats erfolgte im Spender, um eine protektive Wirkung bereits während warmer Ischämie und hypothermer Langzeitkonservierung zu gewährleisten. Zwar konnten unmittelbar nach Konservierung keine wesentlichen histologischen Veränderungen festgestellt werden, es zeigte sich aber bei den mit Konjugat behandelten Lungen eine signifikante Reduktion des Flüssigkeitsanteils am Gesamtgewicht. Dies bedeutet zum einen, dass es bei Vehikel- bzw. mit Einzelsubstanzen behandelten Spenderlungen schon während Ischämie und Lagerung zu einer Schädigung des pulmonalen Endothels mit konsekutiver endothelialer Schrankenstörung kommt. Diese resultiert schließlich in der Entstehung eines intraalveolären und interstitiellen Ödems. Diese Veränderungen am Lungengewebe konnten durch das anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat signifikant verbessert werden. Eine Reduktion der Schädigung der NHBD-Lunge während warmer Ischämie und anschließender kalter Konservierung könnte eine wesentliche Grundlage der deutlich verbesserten Transplantatfunktion nach nachfolgender

Reperfusion darstellen (vgl. nahezu normaler Gasaustausch der mit anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat Spenderlungen 6 Stunden nach Reperfusion).

Die fehlenden Unterschiede in der MPO-Aktivität zwischen den Behandlungsgruppen und gegenüber sham-operierten Tieren belegt, dass es im Rahmen der warmen Ischämie und der anschließenden kalten Konservierung nicht zu einer relevanten Leukozytenimmigration in die Spenderlunge kommt. Die Migration von Leukozyten ist ein Energie-abhängiger Prozess. Daher könnte die reduzierte Sauerstoffspannung im Rahmen der warmen Ischämie zwar die Zellvitalität gewährleisten, jedoch für eine relevante Migration von Leukozyten nicht ausreichend sein. Die fehlende Leukozytenakkumulation im Rahmen der kalten Konservierung ist außerdem dadurch bedingt, dass die Lungen vor Lagerung mit Leukozyten-freier Konservierungslösung (Perfadex®) perfundiert wurden. Die Lagerung der Lungen erfolgte zudem bei 4°C, was zu einer drastischen Reduktion des temperaturabhängigen zellulären Metabolismus führt. Auch die Migrationskapazität im Gefäßbett der NHBD-Lunge verbleibender Leukozyten wird damit bei 4°C Lagerung auf ein Minimum reduziert (Inamasu et al., 2001).

Auch wenn eine relevante Akkumulation von Leukozyten fehlt, so kommt es dennoch bereits während warmer Ischämie zu einem messbaren oxidativen Stress. Entsprechend zeigte sich bei allen NHBD-Lungen eine gesteigerte Lipidperoxidation im Vergleich zu sham-operierten Tieren. Dies ist in Übereinstimmung mit bereits publizierten Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die nach alleiniger Ischämie ohne Reperfusion bereits einen gesteigerten oxidativen Stress mit Zunahme der Lipidperoxidation nachweisen konnten (Esme et al., 2006). Die Lipidperoxidation (TBARS) in der Konjugatgruppe war tendenziell im Vergleich zu den anderen NHBD-Lungen geringer ausgeprägt. Zudem zeigten die nach der Konservierung in der BALF untersuchten ortsansässigen Leukozyten (insbesondere Alveolarmakrophagen) eine signifikant höhere Vitalität in der Konjugatgruppe. Dies lässt darauf schließen, dass die Reduktion der Lipidperoxidation durch Behandlung mit anti-PECAM/Katalase zu einer Protektion residenter pulmonaler Leukozyten führt, welche für die Integrität der Lunge von herausragender Bedeutung sind (Seal and Gewertz, 2005; van Klaveren et al., 1997).

5.3.4 Auswirkungen des Ischämie-Reperfusionsschadens auf die kontralaterale Nativlunge

Im Rahmen von Ischämie und Reperfusion des transplantierten Organs werden Mediatoren freigesetzt, die ihre Wirkung nicht nur lokal am Transplantat entfalten, sondern auch auf

Organfunktionen jenseits des Transplantats im Sinne einer systemischen Auswirkung des Ischämie-Reperfusionsschadens Einfluss nehmen können. Die Schädigung primär nicht von der Ischämie und Reperfusion betroffener Organe des Empfängers wird als sogenannter *Distant Organ Injury* bezeichnet (Seekamp and Ward, 1993). Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und die Produktion von TNF- α durch Alveolarmakrophagen konnte beispielsweise experimentell durch Ischämie und Reperfusion des Dünndarms gesteigert werden (Souza, Jr. et al., 2000). Insbesondere die kontralaterale Nativlunge des Empfängers ist von den Auswirkungen der Ischämie und Reperfusion im Rahmen der Lungentransplantation betroffen. Tatsächlich zeigte die Nativlunge des Empfängers eine im Vergleich zu Lungen sham-operierter Tiere reduzierte Gasaustauschfunktion, eine gesteigerte Akkumulation von Leukozyten und eine reduzierte Vitalität residenter Alveolarmakrophagen. Neben aus dem Transplantat freigesetzten inflammatorischen Mediatoren mit systemischer Leukozytenaktivierung und konsekutivem *Distant Organ Injury* (s.o.), könnte auch die Einzellungenbeatmung während der Präparation und Implantation sowie die eingeschränkte Funktion des Transplantats für die reduzierte Funktion der Nativlunge mitverantwortlich sein.

Das Ausmaß des *Distant Organ Injury* konnte durch die Behandlung mit Konjugat reduziert werden. Entsprechend zeigte der PaO₂ in der Konjugatgruppe einen Anstieg auf Sham-Niveau während die CO₂-Retention tendenziell reduziert werden konnte. Die durch die Konjugatbehandlung verbesserte Transplantatfunktion scheint sich damit indirekt zu einem verminderten Kollateralschaden der Nativlunge zu führen. Die verbesserte Funktion der kontralateralen Lunge nach Behandlung mit Konjugat zeigt sich auch in einem verringertem pulmonalen Shuntvolumen der Nativlunge. Die Mikrozirkulation in der Nativlunge profitiert damit von den günstigeren Perfusions - und Ventilationsverhältnissen im Transplantat.

Auch die Leukozytenrekrutierung in der Nativlunge konnte durch die Transplantatvorbehandlung signifikant reduziert werden. Da geschädigtes Endothel ein wichtiger Trigger für die Leukozytenadhäsion und Migration ist (Cavanagh et al., 1998; Muller et al., 1998; Mempel et al., 2003; Kuebler, 2005), lässt diese Beobachtung auf eine indirekt protektive Wirkung der Transplantatvorbehandlung mit dem anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat auf die endotheliale Integrität auch der Nativlunge schließen. Neben indirekten humoralen Faktoren könnten auch direkte Effekte wie eine reduzierte lokale Aktivierung von Leukozyten in der Mikrostrombahn des Transplantats mit verminderter anschließender Migration in die kontralaterale Lunge zur reduzierten Leukozytenakkumulation in der Nativlunge der Empfänger von mit Konjugat behandelten Lungen beitragen (Bryan et al., 1999).

Schließlich zeigte sich bei der Analyse der BAL der Nativlunge ein positiver Effekt der Konjugatvorbehandlung auf die Vitalität der Leukozyten und Alveolarmakrophagen. Es konnte hier eine signifikant erhöhte Vitalität in der Konjugat- und Gemischgruppe nachgewiesen werden. Möglicherweise kann die hohe Vitalität dieser Zellen und die im Vergleich zum Transplantat geringen morphologischen Veränderungen und Schäden der Nativlunge zusätzlich zu einer suffizienteren antioxidativen Funktion der Leukozyten selbst und letztendlich zu einer besseren Abwehr der negativen Einflüsse (verbesserte Schrankenfunktion) im Rahmen von Ischämie und Reperfusion beitragen.

5.4 Zusammenfassung

Die Lungentransplantation stellt derzeit die einzige Therapieoption für Patienten mit terminaler Lungeninsuffizienz dar. Vergleicht man jedoch die steigenden Zahlen der Neuanmeldungen zur Lungentransplantation mit der Zahl derzeit verfügbarer Organen, so wird der aktuelle Mangel an Spenderorganen offensichtlich. Der Einsatz von Lungen herztoter Spender (NHBD-Lungen) könnte in der Zukunft eine wesentliche Erweiterung des Organangebots bedeuten und stellt damit eine große Chance für die Transplantationschirurgie dar. In Europa werden mehr als die Hälfte der Todesfälle durch kardiale und zerebrovaskuläre Krankheiten verursacht (Steen et al., 2001). Mit dieser Gruppe besteht ein großes potentiell Reservoir an Spenderorganen. Tatsächlich konnte bereits von Steen et al. (Steen et al., 2001) über die erfolgreiche Transplantation einer Einzellunge eines an Myokardinfarkt verstorbenen Patienten berichtet werden. Gamez et al. transplantierten zudem erfolgreich weitere humane NHBD-Lungen, sowohl als Einzel, als auch als Doppellungentransplantation (Gamez et al., 2005).

Dennoch stellt die Transplantation von NHBD-Lungen derzeit aufgrund der ausgeprägten Schädigung der Organe kein Routineverfahren in der heutigen Transplantationsmedizin dar und die Transplantation von NHBD-Lungen hat sich bisher nicht als Alternative zu Organen herzschlagender Spender durchgesetzt. Der Einsatz von NHBD-Lungen würde jedoch eine wesentliche Erweiterung des derzeit im Vergleich zum tatsächlichen Bedarf stark limitierten Spenderpools darstellen (Abb. 1.1a). Die Entwicklung neuer Strategien zur Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens von NHBD-Lungen steht daher im Mittelpunkt der aktuellen Forschung in der modernen Transplantationsmedizin (Akao et al., 2006; Neyrinck et al., 2006; Nunez et al., 2005).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte einer innovativen antioxidativen Strategie (*vaskuläres Immunotargeting*) auf den Ischämie-Reperfusionsschaden von NHBD-Lungen im Grosstiermodell am Schwein im Detail zu untersuchen. Hierzu wurden Hausschweine vor

Induktion des Herztodes mit anschließender warmer pulmonaler Ischämie mit an anti-PECAM-1 monoklonale Antikörper gekoppelter Katalase vorbehandelt. Die Lungen wurden anschließend einer kalten Konservierung für 18 Stunden unterzogen und in Empfängertiere implantiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch die Spendervorbehandlung mit anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat das Transplantat während der Ischämiezeit und nach Reperfusion suffizient vor dem Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies geschützt werden konnte. Der oxidative Stress und die damit assoziierte Lipidperoxidation wurden durch anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat bereits während Ischämie und Konservierung, insbesondere aber im Rahmen der anschließenden Reperfusion drastisch reduziert. Entsprechend zeigte sich eine verbesserte endotheliale Integrität mit reduzierter Schrankenstörung und verminderter intraalveolärer Ödembildung bei mit anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat vorbehandelten Spenderlungen. Dies resultierte nach Transplantation der vorbehandelten Lungen in einer im Vergleich zu Vehikel-behandelten Spenderorganen signifikant verbesserten Lungenfunktion mit exzellentem Gasaustausch, der sich auf dem Niveau nicht-transplantierte Lungen scheinoperierter Tiere bewegte.

Zusätzlich beeinflusste die optimierte Funktion des Transplantats auch die native Empfängerlunge. Der als *Distant Organ Injury* bezeichnete Kollateralschaden der Nativlunge, der überwiegend durch Freisetzung humoraler inflammatorischer Mediatoren im Rahmen des Ischämie- Reperfusionsschadens, aber auch durch die lokale Aktivierung zirkulierender Leukozyten im Transplantat und deren anschließende Migration in die native Lunge entsteht, konnte durch die antioxidative Therapie des Transplantats positiv beeinflusst werden. Entsprechend zeigte die Nativlunge nach Transplantation von mit dem Konjugat vorbehandelten Lungen eine dramatische Verbesserung der Gasaustauschfunktion sowie eine Reduktion lokaler inflammatorischer Prozesse.

Insgesamt konnte damit durch das anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat 1.) die Schädigung der NHBD-Lungen *per se* signifikant verringert werden und die Transplantatfunktion dramatisch verbessert werden. Außerdem führte die Vorbehandlung mit anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugat 2.) über eine Reduktion des Kollateralschadens zu einer deutlichen Verbesserung der Funktion auch der Nativlunge des Empfängers.

Obwohl die Lungen von *Non Heart Beating Donors* präoperativ zahlreiche der momentan in der Klinik gültigen Selektionskriterien nicht erfüllen, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erstmals im Grosstiermodell, dass durch eine neuartige protektive antioxidative

Therapie, dem vaskulären Immunotargeting mittels anti-PECAM-1/NA/Katalase Konjugaten, eine exzellente Transplantatfunktion dieser Lungen erreicht werden kann. Die Durchführung von Versuchen mit längeren Beobachtungszeiträumen und insbesondere die Beurteilung der Effekte auf das Überleben der Empfänger wird in Zukunft nötig sein, um zu untersuchen, inwieweit die oben dargestellten positiven Effekte auch den postoperativen Langzeitverlauf der Organempfänger beeinflussen können.

6. Literaturverzeichnis

1. Akao,T., Takeyoshi,I., Totsuka,O., Arakawa,K., Muraoka,M., Kobayashi,K., Konno,K., Matsumoto,K., and Morishita,Y. (2006). Effect of the free radical scavenger MCI-186 on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs. *J Heart Lung Transplant.* 25, 965-971.
2. Atochina,E.N., Balyasnikova,I.V., Danilov,S.M., Granger,D.N., Fisher,A.B., and Muzykantov,V.R. (1996). Immunotargeting of catalase to ACE or ICAM-1 protects perfused rat lungs against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5213-8.
3. Atochina,E.N., Balyasnikova,I.V., Danilov,S.M., Granger,D.N., Fisher,A.B., and Muzykantov,V.R. (1998). Immunotargeting of catalase to ACE or ICAM-1 protects perfused rat lungs against oxidative stress. *Circ Res* 83, 730-7.
4. Battafarano,R.J., Anderson,R.C., Meyers,B.F., Guthrie,T.J., Schuller,D., Cooper,J.D., and Patterson,G.A. (2000). Perioperative complications after living donor lobectomy. *J Thorac. Cardiovasc. Surg.* 120, 909-915.
5. Bhorade,S.M., Vigneswaran,W., McCabe,M.A., and Garrity,E.R. (1993). Liberalization of donor criteria may expand the donor pool without adverse consequence in lung transplantation. *Ann Surg* 217, 518-22.
6. Binns,O.A., DeLima,N.F., Buchanan,S.A., Nichols,G.E., Cope,J.T., King,R.C., Marek,C.A., Tribble,C.G., and Kron,I.L. (1996). Impaired bronchial healing after lung donation from non-heart-beating donors. *J Accid Emerg Med* 13, 321-4.
7. Brown,S., Heinisch,I., Ross,E., Shaw,K., Buckley,C.D., and Savill,J. (2002). Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* 418, 200-203.
8. Bryan,C.L., Patefield,A.J., Cohen,D., Nielsen,J.L., Emanuel,B., and Calhoun,J.H. (1999). Assessment of injury in transplanted and nontransplanted lungs after 6 h of cold storage with glutathione. *Chest* 115, 403-9.
9. Buchanan,S.A., DeLima,N.F., Binns,O.A., Mauney,M.C., Cope,J.T., Langenburg,S.E., Shockey,K.S., Bianchi,J.D., Parekh,V.I., Tribble,C.G., and et al. (1996). Pulmonary function after non-heart-beating lung donation in a survival model. *J Heart Lung Transplant* 15, 1084-92.
10. Carrion,C., de Madariaga,M.A., and Domingo,J.C. (2004). In vitro cytotoxic study of immunoliposomal doxorubicin targeted to human CD34(+) leukemic cells. *Life Sci.* 75, 313-328.
11. Cavanagh,S.P., Gough,M.J., and Homer-Vanniasinkam,S. (1998). The role of the neutrophil in ischaemia-reperfusion injury: potential therapeutic interventions. *Cardiovasc. Surg.* 6, 112-118.
12. Christofidou-Solomidou,M. and Muzykantov,V.R. (2006). Antioxidant strategies in respiratory medicine. *Treat. Respir. Med* 5, 47-78.
13. Christofidou-Solomidou,M., Scherpereel,A., Wiewrodt,R., Ng,K., Sweitzer,T., Arguiri,E., Shuvaev,V., Solomides,C.C., Albelda,S.M., and Muzykantov,V.R. PECAM-directed delivery of catalase to endothelium protects against pulmonary vascular oxidative stress.

14. Christofidou-Solomidou,M., Scherpereel,A., Wiewrodt,R., Ng,K., Sweitzer,T., Arguiri,E., Shuvaev,V., Solomides,C.C., Albelda,S.M., and Muzykantov,V.R. (2003). PECAM-directed delivery of catalase to endothelium protects against pulmonary vascular oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, 1339-47.
15. Cooper,J.D. and Vreim,C.E. (1999). NHLBI workshop summary. Biology of lung preservation for transplantation. *J Heart Lung Transplant* 18, 1151-72.
16. Cozzi,E., Bosio,E., Seveso,M., Vadori,M., and Ancona,E. (2006). Xenotransplantation--current status and future perspectives. *Br. Med Bull.* 75-76, 99-114.
17. Cremona,G., Wood,A.M., Hall,L.W., Bower,E.A., and Higenbottam,T. (1994). Effect of inhibitors of nitric oxide release and action on vascular tone in isolated lungs of pig, sheep, dog and man. *J Physiol* 481 (Pt 1), 185-195.
18. Cryer,H.G. (1977). Therapeutic approaches for clinical ischemia and reperfusion injury. *Anal Biochem* 83, 346-56.
19. Danilov,S.M., Gavriluk,V.D., Franke,F.E., Pauls,K., Harshaw,D.W., McDonald,T.D., Miletich,D.J., and Muzykantov,V.R. (2001). Lung uptake of antibodies to endothelial antigens: key determinants of vascular immunotargeting. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1295-302.
20. Davies,M.G. and Hagen,P.O. (1998). The vascular endothelium. A new horizon. *Hum Gene Ther* 9, 1487-96.
21. Davis,R.D., Jr. and Pasque,M.K. (1998). Pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg* 65, 913-8.
22. Ding,B.S., Gottstein,C., Grunow,A., Kuo,A., Ganguly,K., Albelda,S.M., Cines,D.B., and Muzykantov,V.R. (2005). Endothelial targeting of a recombinant construct fusing a PECAM-1 single-chain variable antibody fragment (scFv) with prourokinase facilitates prophylactic thrombolysis in the pulmonary vasculature. *Blood* 106, 4191-4198.
23. Dziubla,T.D., Karim,A., and Muzykantov,V.R. (2005). Polymer nanocarriers protecting active enzyme cargo against proteolysis. *J Control Release* 102, 427-439.
24. Egan,T.M., Hoffmann,S.C., Sevala,M., Sadoff,J.D., and Schlidt,S.A. (2006). Nitroglycerin reperfusion reduces ischemia-reperfusion injury in non-heart-beating donor lungs. *J Heart Lung Transplant.* 25, 110-119.
25. Egan,T.M., Lambert,C.J., Jr., Reddick,R., Ulicny,K.S., Jr., Keagy,B.A., and Wilcox,B.R. (1995). A strategy to increase the donor pool: use of cadaver lungs for transplantation. *J Surg Res* 59, 468-74.
26. Eppihimer,M.J. and Granger,D.N. (1997). Ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelial interactions in postcapillary venules. *Shock* 8, 16-25.
27. Eppinger,M.J., Jones,M.L., Deeb,G.M., Bolling,S.F., and Ward,P.A. (1991). Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung. *Ann Thorac Surg* 52, 1113-20.

28. Esme,H., Fidan,H., Koken,T., and Solak,O. (2006). Effect of lung ischemia--reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *Eur. J Cardiothorac. Surg.* 29, 294-298.
29. Estenne,M. and Kotloff,R.M. (2006). Update in transplantation 2005. *Am. J Respir. Crit Care Med* 173, 593-598.
30. Fischer,S., Hopkinson,D., Liu,M., MacLean,A.A., Edwards,V., Cutz,E., and Keshavjee,S. (2001). Raffinose improves 24-hour lung preservation in low potassium dextran glucose solution: a histologic and ultrastructural analysis. *Ann. Thorac. Surg.* 71, 1140-1145.
31. Fisher,A.B., Al-Mehdi,A.B., and Muzykantov,V. (1999). Activation of endothelial NADPH oxidase as the source of a reactive oxygen species in lung ischemia. *Am J Physiol* 277, 271-81.
32. Gamez,P., Cordoba,M., Ussetti,P., Carreno,M.C., Alfageme,F., Madrigal,L., Nunez,J.R., Calatayud,J., Ramos,M., Salas,C., and Varela,A. (2005). Lung transplantation from out-of-hospital non-heart-beating lung donors. one-year experience and results. *J Heart Lung Transplant.* 24, 1098-1102.
33. Geronikaki,A.A. and Gavalas,A.M. (2006). Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* 9, 425-442.
34. Greenwald,R.A. (1994). Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Shock* 2, 311-9.
35. Groth,C.G. (2006). Progress in xenotransplantation: a personal view. *Xenotransplantation.* 13, 179-181.
36. Gunes,A., Aboyoun,C.L., Morton,J.M., Plit,M., Malouf,M.A., and Glanville,A.R. (2006). Lung transplantation for chronic obstructive pulmonary disease at St Vincent's Hospital. *Intern. Med J* 36, 5-11.
37. Hardy,J.D. (1999). The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant. Proc.* 31, 25-29.
38. Hassan,T.B., Joshi,M., Quinton,D.N., Elwell,R., Baines,J., and Bell,P.R. (1997). Role of the accident and emergency department in the non-heart-beating donor programme in Leicester. *Br Med Bull* 53, 844-53.
39. Haverich,A. (1990). [Lung transplantation]. *Pneumologie* 44 Suppl 1, 412-417.
40. Hesse,A.K., Dorger,M., Kupatt,C., and Krombach,F. (2004). Proinflammatory role of inducible nitric oxide synthase in acute hyperoxic lung injury. *Respir. Res.* 5, 11.
41. Hiraga,S. (1992). An overview of current non-heart-beating donor transplantation. *J Appl Physiol* 72, 621-8.
42. Hosenpud,J.D., Bennett,L.E., Keck,B.M., Boucek,M.M., and Novick,R.J. (2001). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: eighteenth Official Report-2001. *J Heart Lung Transplant.* 20, 805-815.
43. Iacono,A.T., Johnson,B.A., Grgurich,W.F., Youssef,J.G., Corcoran,T.E., Seiler,D.A., Dauber,J.H., Smaldone,G.C., Zeevi,A., Yousem,S.A., Fung,J.J.,

- Burckart,G.J., McCurry,K.R., and Griffith,B.P. (2006). A randomized trial of inhaled cyclosporine in lung-transplant recipients. *N Engl J Med* 354, 141-150.
44. Inamasu,J., Suga,S., Sato,S., Horiguchi,T., Akaji,K., Mayanagi,K., and Kawase,T. (2001). Intra-ischemic hypothermia attenuates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and migration of neutrophil. *Neurol. Res.* 23, 105-111.
45. Jackson,D.E. (2003). The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Lett.* 540, 7-14.
46. Keck,B.M., Bennett,L.E., Rosendale,J., Daily,O.P., Novick,R.J., and Hosenpud,J.D. (1999). Worldwide thoracic organ transplantation: a report from the UNOS/ISHLT International Registry for Thoracic Organ Transplantation. *Clin. Transpl.* 35-49.
47. Kemming,G.I., Merkel,M.J., Schallerer,A., Habler,O.P., Kleen,M.S., Haller,M., Briegel,J., Vogelmeier,C., Furst,H., Reichart,B., and Zwissler,B. (1998). Inhaled nitric oxide (NO) for the treatment of early allograft failure after lung transplantation. Munich Lung Transplant Group. *Intensive Care Med* 24, 1173-1180.
48. Kishima,H., Takeda,S., Miyoshi,S., Matsumura,A., Minami,M., Utsumi,T., Omori,K., Nakahara,K., and Matsuda,H. (1994). Microvascular permeability of the non-heart-beating rabbit lung after warm ischemia and reperfusion: role of neutrophil elastase. *J Heart Lung Transplant* 13, 741-7.
49. Kootstra,G. (1997). The asystolic, or non-heartbeating, donor. *Transplant Proc* 29, 3559-60.
50. Kozower,B.D., Christofidou-Solomidou,M., Sweitzer,T.D., Muro,S., Buerk,D.G., Solomides,C.C., Albelda,S.M., Patterson,G.A., and Muzykantov,V.R. (2003). Immunotargeting of catalase to the pulmonary endothelium alleviates oxidative stress and reduces acute lung transplantation injury. *Free Radic Biol Med* 34, 1035-46.
51. Kuebler,W.M. (2005). Inflammatory pathways and microvascular responses in the lung. *Pharmacol. Rep.* 57 Suppl, 196-205.
52. Kuebler,W.M., Abels,C., Schuerer,L., and Goetz,A.E. (1996). Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. *Int. J Microcirc. Clin. Exp.* 16, 89-97.
53. Kuebler,W.M. and Goetz,A.E. (2002). The margined pool. *Eur. Surg. Res.* 34, 92-100.
54. Land W,M.K. (1996). The impact of ischemia/reperfusion injury on specific and non-specific, early and late chronic events after organ transplantation. *Transplantation Reviews* 10, 108-127.
55. Li,S., Tan,Y., Viroonchatapan,E., Pitt,B.R., and Huang,L. (1999). Targeted gene delivery to pulmonary endothelium by anti-PECAM antibody. *Am J Physiol* 277, 271-81.
56. Liao,F., Huynh,H.K., Eiroa,A., Greene,T., Polizzi,E., and Muller,W.A. (1996). Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J Biol Chem* 271, 11090-8.
57. Loehe,F., Mueller,C., Annecke,T., Minor,T., Bittmann,I., Krombach,F., and Messmer,K. (2002). Tissue damage of non-heart-beating donor lungs after long-

- term preservation: evaluation of histologic alteration, bronchoalveolar lavage, and energy metabolism. *Shock* 17(6):502-7
58. Loehe,F., Mueller,C., Annecke,T., Siebel,A., Bittmann,I., Messmer,K.F., and Schildberg,F.W. (2002). Pulmonary graft function after long-term preservation of non-heart-beating donor lungs. *Ann Thorac Surg* 59(5):1556-62
 59. Loehe,F., Preissler,G., Annecke,T., Bittmann,I., Jauch,K.W., and Messmer,K. (2004). Continuous infusion of nitroglycerin improves pulmonary graft function of non-heart-beating donor lungs. *Transplantation* 77, 1803-1808.
 60. Luscinskas,F.W., Ma,S., Nusrat,A., Parkos,C.A., and Shaw,S.K. (2002). The role of endothelial cell lateral junctions during leukocyte trafficking. *Immunol. Rev.* 186, 57-67.
 61. Mallory,G.B., Jr. and Cohen,A.H. (1997). Donor considerations in living-related donor lung transplantation. *Clin. Chest Med* 18, 239-244.
 62. Mempel,T.R., Moser,C., Hutter,J., Kuebler,W.M., and Krombach,F. (2003). Visualization of leukocyte transendothelial and interstitial migration using reflected light oblique transillumination in intravital video microscopy. *J Vasc. Res.* 40, 435-441.
 63. Moffatt,S., Papasakelariou,C., Wiehle,S., and Cristiano,R. (2006). Successful in vivo tumor targeting of prostate-specific membrane antigen with a highly efficient J591/PEI/DNA molecular conjugate. *Gene Ther.*
 64. Müller C, Hoffmann,H, Bittmann,I, Isselhard,W, Messmer,K., Dienemann,H, Schildberg,F. (1997). Hypothermic storage alone in lung preservation for transplantation. A metabolic, light microscopic and functional analysis after 18 hours of preservation. *Transplantation* 63, 625-630.
 65. Muller,C., Hoffmann,H., Bittmann,I., Isselhard,W., Messmer,K., Dienemann,H., and Schildberg,F.W. (1999). Hypothermic storage alone in lung preservation for transplantation: a metabolic, light microscopic, and functional analysis after 18 hours of preservation. *World J Surg* 23, 1156-62.
 66. Muller,W.A., Weigl,S.A., Deng,X., and Phillips,D.M. (1998). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *Am J Physiol* 275, 806-17.
 67. Muro,S., Cui,X., Gajewski,C., Murciano,J.C., Muzykantov,V.R., and Koval,M. (2001). Slow intracellular trafficking of catalase nanoparticles targeted to ICAM-1 protects endothelial cells from oxidative stress. *J Control Release* 71, 1-21.
 68. Muro,S., Muzykantov,V.R., and Murciano,J.C. (2004). Characterization of endothelial internalization and targeting of antibody-enzyme conjugates in cell cultures and in laboratory animals. *Methods Mol. Biol.* 283, 21-36.
 69. Muro,S., Wiewrodt,R., Thomas,A., Koniaris,L., Albelda,S.M., Muzykantov,V.R., and Koval,M. (2003b). A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *Nat Biotechnol* 21, 392-8.
 70. Muro,S., Wiewrodt,R., Thomas,A., Koniaris,L., Albelda,S.M., Muzykantov,V.R., and Koval,M. (2003a). A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *J Cell Sci.* 116, 1599-1609.

71. Muzykantov,V.R. (1994). Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J Pharmacol Exp Ther* 271, 1672-7.
72. Muzykantov,V.R. (2001a). Delivery of antioxidant enzyme proteins to the lung. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, 2126-35.
73. Muzykantov,V.R. (2001b). Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *Antioxid Redox Signal* 3, 39-62.
74. Muzykantov,V.R. (2005). Biomedical aspects of targeted delivery of drugs to pulmonary endothelium. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 2, 909-926.
75. Muzykantov,V.R., Atochina,E.N., Ischiropoulos,H., Danilov,S.M., and Fisher,A.B. (1996). Immunotargeting of antioxidant enzyme to the pulmonary endothelium. *J Pharmacol Exp Ther* 279, 1026-34.
76. Muzykantov,V.R., Christofidou-Solomidou,M., Balyasnikova,I., Harshaw,D.W., Schultz,L., Fisher,A.B., and Albelda,S.M. (1999). Streptavidin facilitates internalization and pulmonary targeting of an anti-endothelial cell antibody (platelet-endothelial cell adhesion molecule 1): a strategy for vascular immunotargeting of drugs. *Chest* 116, 25S-26S.
77. Neumann,P. and Hedenstierna,G. (2001). Ventilation-perfusion distributions in different porcine lung injury models. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 45, 78-86.
78. Newman,P.J. (1994). The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 714, 165-174.
79. Newman,P.J. (2003). The biology of PECAM-1. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1600-19.
80. Newman,P.J., Berndt,M.C., Gorski,J., White,G.C.2., Lyman,S., Paddock,C., and Muller,W.A. (1990). PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *J Cell Biol* 110, 1227-37.
81. Newman,P.J. and Newman,D.K. (2002). Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 777-86.
82. Newman,P.J. and Newman,D.K. (2003). Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 953-964.
83. Neyrinck,A.P., Van De,W.C., Geudens,N., Rega,F.R., Verleden,G.M., Wouters,P., Lerut,T.E., and Van Raemdonck,D.E. (2006). Comparative study of donor lung injury in heart-beating versus non-heart-beating donors. *Eur. J Cardiothorac. Surg.*
84. Niemer M,N.C.L.-H.P.B.G. (1992). *Datenbuch Intensivmedizin. Datenbuch Intensivmedizin*, Stuttgart, Jena, New York, Gustav-Fischer Verlag 104-110.
85. Nobs,L., Buchegger,F., Gurny,R., and Allemann,E. (2006). Biodegradable Nanoparticles for Direct or Two-Step Tumor Immunotargeting. *Bioconjug. Chem.* 17, 139-145.
86. Novick,R.J., Gehman,K.E., Ali,I.S., and Lee,J. (1997). Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. *Transplantation* 63, 625-30.

87. Nunez,J.R., Del Rio,F., Lopez,E., Moreno,M.A., Soria,A., and Parra,D. (2005). Non-heart-beating donors: an excellent choice to increase the donor pool. *Transplant. Proc.* 37, 3651-3654.
88. Osawa,M., Masuda,M., Kusano,K., and Fujiwara,K. (2002). Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? *J Cell Biol.* 158, 773-785.
89. Pietarinen-Runtti,P., Lakari,E., Raivio,K.O., and Kinnula,V.L. (2000). Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Eur Respir J* 16, 534-54.
90. Post,S. and Messmer,K. (1997). [The role of reperfusion damage]. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1187-205.
91. Rega,F.R., Neyrinck,A.P., Verleden,G.M., Lerut,T.E., and Van Raemdonck,D.E. (2004). How long can we preserve the pulmonary graft inside the nonheart-beating donor? *Ann. Thorac. Surg.* 77, 438-444.
92. Reitz,B.A., Wallwork,J.L., Hunt,S.A., Pennock,J.L., Billingham,M.E., Oyer,P.E., Stinson,E.B., and Shumway,N.E. (1982). Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N. Engl. J. Med.* 306, 557-564.
93. Sakamaki,F., Hoffmann,H., Muller,C., Dienemann,H., Messmer,K., and Schildberg,F.W. (1996). Reduced lipid peroxidation and ischemia-reperfusion injury after lung transplantation using low-potassium dextran solution for lung preservation. *Chirurg* 67, 318-23.
94. Scherpereel,A., Rome,J.J., Wiewrodt,R., Watkins,S.C., Harshaw,D.W., Alder,S., Christofidou-Solomidou,M., Haut,E., Murciano,J.C., Nakada,M., Albelda,S.M., and Muzykantov,V.R. (2002). Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1-directed immunotargeting to cardiopulmonary vasculature. *Am J Pathol* 160, 1155-69.
95. Seal,J.B. and Gewertz,B.L. (2005). Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann. Vasc. Surg.* 19, 572-584.
96. Seekamp,A. and Ward,P.A. (1993). Ischemia-reperfusion injury. *Agents Actions Suppl* 41, 137-152.
97. Shiraishi,Y., Lee,J.R., Laks,H., Waters,P.F., Meneshian,A., Blitz,A., Johnson,K., Lam,L., and Chang,P.A. (2001). L-arginine administration during reperfusion improves pulmonary function. *J Heart Lung Transplant* 20, 559-67.
98. Simpson,D.G. and Bowlin,G.L. (2006). Tissue-engineering scaffolds: can we re-engineer mother nature? *Expert. Rev. Med Devices* 3, 9-15.
99. Southard,J.H., Marsh,D.C., McAnulty,J.F., and Belzer,F.O. (1987). Oxygen-derived free radical damage in organ preservation: activity of superoxide dismutase and xanthine oxidase. *Surgery* 101, 566-570.
100. Souza,A.L., Jr., Poggetti,R.S., Fontes,B., and Birolini,D. (2000). Gut ischemia/reperfusion activates lung macrophages for tumor necrosis factor and hydrogen peroxide production. *J Trauma* 49, 232-236.
101. Starnes,V.A., Barr,M.L., Schenkel,F.A., Horn,M.V., Cohen,R.G., Hagen,J.A., and Wells,W.J. (1997). Experience with living-donor lobar transplantation for indications other than cystic fibrosis. *J Thorac. Cardiovasc. Surg.* 114, 917-921.

102. Starnes,V.A., Woo,M.S., MacLaughlin,E.F., Horn,M.V., Wong,P.C., Rowland,J.M., Durst,C.L., Wells,W.J., and Barr,M.L. (1999). Comparison of outcomes between living donor and cadaveric lung transplantation in children. *Ann. Thorac. Surg.* 68, 2279-2283.
103. Steen,S., Sjoberg,T., Ingemansson,R., and Lindberg,L. (1994a). Efficacy of topical cooling in lung preservation: is a reappraisal due? *Ann. Thorac. Surg.* 58, 1657-1663.
104. Steen,S., Sjoberg,T., Massa,G., Ericsson,L., and Lindberg,L. (1990). Safe pulmonary preservation for 12 hours with low-potassium-dextran solution. *Transplantation* 49, 690-4.
105. Steen,S., Sjoberg,T., Pierre,L., Liao,Q., Eriksson,L., and Algotsson,L. (1994b). Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *J Appl Physiol* 76, 1232-41.
106. Steen,S., Sjoberg,T., Pierre,L., Liao,Q., Eriksson,L., and Algotsson,L. (2001). Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet* 357, 825-829.
107. Sweitzer,T.D., Thomas,A.P., Wiewrodt,R., Nakada,M.T., Branco,F., and Muzykantov,V.R. (2003). PECAM-directed immunotargeting of catalase: specific, rapid and transient protection against hydrogen peroxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, 283-92.
108. Toronto lung transplant group (1986). Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 314, 1140-1145.
109. Trulock,E.P., Edwards,L.B., Taylor,D.O., Boucek,M.M., Mohacsi,P.J., Keck,B.M., and Hertz,M.I. (2003). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twentieth Official adult lung and heart-lung transplant report--2003. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 953-64.
110. van Klaveren,R.J., Demedts,M., and Nemery,B. (1997). Cellular glutathione turnover in vitro, with emphasis on type II pneumocytes. *Eur. Respir. J* 10, 1392-1400.
111. Van Raemdonck,D.E., Rega,F.R., Neyrinck,A.P., Jannis,N., Verleden,G.M., and Lerut,T.E. (2004). Non-heart-beating donors. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 16, 309-321.
112. Vaporciyan,A.A., DeLisser,H.M., Yan,H.C., Mendiguren,I., Thom,S.R., Jones,M.L., Ward,P.A., and Albelda,S.M. (2001). Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Blood* 97, 1727-32.
113. Walther,F.J., Kuipers,I.M., Pavlova,Z., Willebrand,D., Abuchowski,A., and Viau,A.T. (1990). Mitigation of pulmonary oxygen toxicity in premature lambs with intravenous antioxidants. *Exp. Lung Res.* 16, 177-189.
114. Weder,W., Harper,B., Shimokawa,S., Miyoshi,S., Date,H., Schreinemakers,H., Egan,T., and Cooper,J.D. (1995). Influence of intraalveolar oxygen concentration on lung preservation in a rabbit model. *Ann Thorac Surg* 59, 7-12.
115. Whitson,B.A., Nath,D.S., Johnson,A.C., Walker,A.R., Prekker,M.E., Radosevich,D.M., Herrington,C.S., and Dahlberg,P.S. (2006). Risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation. *J Thorac. Cardiovasc. Surg.* 131, 73-80.

116. Wiewrodt,R., Thomas,A.P., Cipelletti,L., Christofidou-Solomidou,M., Weitz,D.A., Feinstein,S.I., Schaffer,D., Albelda,S.M., Koval,M., and Muzykantov,V.R. (2002). Size-dependent intracellular immunotargeting of therapeutic cargoes into endothelial cells. *Am J Pathol* 160, 1155-69.
117. Wittwer,T., Franke,U.F., Fehrenbach,A., Ochs,M., Sandhaus,T., Schuette,A., Richter,S., Dreyer,N., Knudsen,L., Muller,T., Schubert,H., Richter,J., and Wahlers,T. (2005). Experimental lung transplantation: impact of preservation solution and route of delivery. *J Heart Lung Transplant*. 24, 1081-1090.
118. Xiong,L., Mazmanian,M., Chapelier,A.R., Reignier,J., Weiss,M., Darteville,P.G., and Herve,P. (1994). Lung preservation with Euro-Collins, University of Wisconsin, Wallwork, and low-potassium-dextran solution. *Universite++ Paris-Sud Lung Transplant Group. Ann. Thorac. Surg.* 58, 845-850.
119. Yusa,T., Crapo,J.D., and Freeman,B.A. (1984). Liposome-mediated augmentation of brain SOD and catalase inhibits CNS O₂ toxicity. *J Appl. Physiol* 57, 1674-1681.

7. Abkürzungen

A.	Arteria	MPO	Myeloperoxidase
ACE	angiotensin converting enzyme	MW	Mittelwert
ATP	Adenosintriphosphat	NA	Neutravidin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage	NHBD	non heart beating donor
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit	NL	Nativlunge
Cdyn	dynamic lung compliance	NO	Stickstoffmonoxid
CO	cardiac output (=HZV)	PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
DCF	Dichlorofluoreszindiacetat	PaCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
DLC	dynamic lung compliance	PBS	phosphate buffered saline
DLS	dynamic light scattering	PCWP	pulmonalkapillärer Verschlussdruck
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation	PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule 1
Hb	Hämoglobin	PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
HBD	heart beating donor	PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
HE	Hämatoxilin-Eosin	PVR	pulmonalvaskulärer Widerstand
HF	Herzfrequenz	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Hkt	Hämatokrit	RPM	rounds per minute
HPF	hundert pro Feld	SEM	standard error of the mean
HUVEC	humane Umbilikalvenen Endothezellen	SVR	systemischer vaskulärer Widerstand
HZV	Herzzeitvolumen	TBARS	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	TX	Transplantation
IRS	Ischämie-Reperfusions- schaden	V.	Vena
KL	konservierte Lunge	ZVD	zentralvenöser Druck
mAb	monoklonaler Antikörper	ZVK	zentraler Venenkatheter
MAP	mittlerer arterieller Druck		
MPAP	mittlerer pulmonalarterieller Druck		

8. Danksagung

Dank gilt allen, die Anteil an dieser Dissertation haben:

Herrn PD Dr. med. F. Löhe danke ich für die Annahme der Arbeit und deren sorgfältige Durchsicht, sowie für seine vielen fachlichen Ratschläge. Durch die stets kollegiale und freundliche Atmosphäre ermöglichte er mir die wissenschaftliche Arbeit in einem motivierenden und lehrreichen Umfeld.

Herrn Dr. med. Gerhard Preissler danke ich für die gute wissenschaftliche Betreuung des Projekts. Besonderer Dank gilt meinem Kodoktoranden Hans Ullrich Ebersberger für seine Mitarbeit und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Ich danke Herrn Prof. A. Baethmann als kommissarischem Leiter des Instituts für chirurgische Forschung, sowie Herrn Prof. U. Pohl als Leiter des ICF für die Aufnahme in das Institut.

Weiter gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. K. Messmer für die vielfältige Unterstützung während der letzten vier Jahre und Herrn Prof. G. Enders für seine fachlichen Ratschläge.

Frau PD Dr. med. I. Bittmann, Institut für Pathologie, LMU München, danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung des Histologie Scores.

Ein herzlicher Dank gilt auch dem gesamten Laborteam des ICF (Frau S. Münzing, Frau G. Höbel, Herrn G. Adams, Frau Ch. Csapo, Frau A. Allmeling, Frau A. Schropp) für die kompetente Unterstützung bei der experimentellen Arbeit und Herrn D. Müller für die gewissenhafte und flexible Organisation und Durchführung des Tiertransports.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, insbesondere bei meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichten und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg für seine außerordentliche Unterstützung, Motivation und Diskussionsbereitschaft.

9. Lebenslauf**Persönliche Daten:**

Name: Ines Victoria Huff
Geburtsdatum: 17. Juli 1980
Geburtsort: Rosenheim
Eltern: Dr. med. Helmut Huff, Gastroenterologe
Edith Huff, geb. Pöschl, Lehrerin

Schulische Ausbildung:

1986-1999: Grundschule und Gymnasium in
Prien/Chiemsee
1999: allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

2000-2006: Medizinstudium, LMU München
05/2006: Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr:

04/05-08/05: Maria-Theresia-Klinik München
Abteilung für Chirurgie
CA Dr. M. Zimmermann

08/05-09/05: Poliklinik der LMU München, Klinikum
Innenstadt, Abt. für Innere Medizin
Prof. Dr. Schlöndorff

09/05-11/05 St. Elizabeth's Medical Center, Boston, USA
Tufts University Boston
Department of Cardiology
Prof. D. M. Losordo, MD

11/05-03/06 New England Baptist Hospital, Boston, USA
Tufts University/ Harvard Medical School
Department of Orthopaedics
Prof. J. Richmond, MD

Postgraduelle Ausbildung:

- 09/02-12/06: Doktorandin am Institut für
Chirurgische Forschung, LMU München
(Direktor: Prof. Dr. U. Pohl)
- 06/06-12/06: Postdoctoral Research Fellow
Institute of Pathology, Harvard Medical School
Boston, USA
Prof. U. von Andrian
- 01/07-10/08 Assistenzärztin in der Klinik für Kardiologie und
internistische Intensivmedizin,
Klinikum München Bogenhausen
Prof. Dr. med. E. Hoffmann
- Seit 12/08 Assistenzärztin in der Klinik für Radiologie,
Universitätsklinikum Ulm
Prof. Dr. med. H.J. Brambs

Extracurriculäre Ausbildung:

- 2001-2002: Studium der Betriebswirtschaft für Mediziner,
Institut für Betriebswirtschaft, Köln
- 2002: Diplom Gesundheitsökonom (BI)

Publikationen/Abstracts:

Hämorrhagischer Schock und Resuscitation bei traumatisierten Organspendern: L-Arginin verbessert die Funktion der transplantierten, vorgeschädigten Lunge. Preissler G., Huff I.V., Ebersberger H. U., Eichhorn M.E., Meßmer K., Jauch K.W., Löhe F. Chirurgisches Forum; Deutscher Chirurgenkongress 2004 **Langenbecks Archiv, Suppl. 2004**

Hemorrhagic shock and resuscitation in traumatized organ donors: impaired lung transplant function is improved by intravenous L-arginine application. Preissler G., Ebersberger H.U., Huff I.V., Eichhorn M.E., Meßmer K., Jauch K.W., Löhe F. **International Society of Heart and Lung Transplantation, 2004**

Immunosurveillance by Hematopoietic Progenitor Cells Trafficking through Blood, Lymph, and Peripheral Tissues. Massberg S., Schaerli P., Knezevic-Maramica I., Köllnberger M., Tubo N., Moseman E. A., Huff I.V., Junt T., Wagers A. J., Mazo I. B., von Andrian U. H. **Cell 2007**

Targeted Delivery of Catalase to the Pulmonary Endothelium Preserves Graft Funktion of Non Heart Beating Donor Lungs in Pigs. Preissler G.*, Loehe F.*, Huff I.V., Ebersberger H.U., Shuvaev V., Bittmann I., Hermanns I., Fischer K., Jauch K.W., Albelda S., Muzykantov V.R., Wiewrodt R. **Transplantation 2008**

Reperfusion with L-arginine improves pulmonary graft function of lungs harvested from haemorrhagic donors
Preissler G., Loehe F., Ebersberger H.U., Huff I.V., Bittmann I., Messmer K., Jauch K.W., Angele M.K. **Transplantation 2008**